

# 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

## —第2報—

*Functional analysis and in vivo effects on genomics of human intestinal flora — No. 2 —*

村上 賢<sup>1</sup>, 森田英利<sup>1</sup>, 加藤行男<sup>1</sup>, 久松 伸<sup>1</sup>, 大島健志朗<sup>2</sup>, 服部正平<sup>2</sup>,  
藤 英博<sup>3</sup>, 高見英人<sup>4</sup>, 五十君静信<sup>5</sup>, 桑原知巳<sup>6</sup>, 高木邦明<sup>7</sup>

<sup>1</sup>麻布大学獣医学部, <sup>2</sup>東京大学大学院, <sup>3</sup>理研 GSC, <sup>4</sup>海洋研究開発機構,  
<sup>5</sup>国立医薬品食品研究所, <sup>6</sup>徳島大学, <sup>7</sup>静岡県立大学

Masaru Murakami<sup>1</sup>, Hidetoshi Morita<sup>1</sup>, Yukio Kato<sup>1</sup>, Shin Hisamatsu<sup>1</sup>, Kenshiro Oshima<sup>2</sup>, Masahira Hattori<sup>2</sup>,  
Hidehiro Toh<sup>3</sup>, Hideto Takami<sup>4</sup>, Shizunobu Igimi<sup>5</sup>, Tomomi Kuwahara<sup>6</sup>, and Kuniaki Takagi<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa,

<sup>2</sup>The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo,

<sup>3</sup>RIKEN Genomic Sciences Center, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa,

<sup>4</sup>Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, 2-15 Natsushima, Yokosuka, Kanagawa,

<sup>5</sup>National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo,

<sup>6</sup>The University of Tokushima Graduate School, 3-18-5 Kuramotocho, Tokushima,

<sup>7</sup>University of Shizuoka School of Pharmaceutical Science, 52-1 Tanida, Suruga, Shizuoka, Japan.

**Abstract:** We sequenced and analyzed the genome of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (also known as *L. rhamnosus* GG), a human isolate, which is one of the most studied probiotic strains. The organism harbored a 3.0-Mb chromosome encoding 2,836 protein-coding genes, and contained a remarkable number of proteins involved in carbohydrate and amino acid metabolism and transport, and defense mechanisms compared with other sequenced intestinal lactobacilli. Comparative genome analysis revealed that extensive synteny was found between *L. rhamnosus* ATCC 53103 and its closely related *L. casei* ATCC 334 (a cheese isolate), but the *L. rhamnosus* genome contains numerous insertions, which reflect potential adaptation to the gut environment, including six carbohydrate utilization gene clusters that consist of the genes for PTS-type transporter system, glycoside hydrolase, and transcriptional regulator. Genome analysis also predicted many cell surface adherence proteins, and its genome encodes functional SpaCBA pili shed on the importance of adhesion to mucus during colonization of the human. Collectively, these features in the *L. rhamnosus* genome are likely to contribute to the organisms' gastric survival and promote interactions with the intestinal mucosa and microbiota.

### 1. 目的

腸内フローラは、ヒトをはじめとする哺乳動物の健康と病気に密接に関係している知見が集積しつつあるが、ヒト腸内フローラを構成する細菌の中には、まだ培養できていないものも存在する。*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 株はヒト消化管から分離さ

れ、培養が容易であり、プロバイオティクス効果の多く報告されている菌株である。この菌株は GG 株として、日本でも発酵乳が市販されている。本プロジェクトでは、安全性の高い細菌のもつ生体（ヒト）に対する影響や重要性を検討することを1つとしている。現在、国際コンソーシアムとしてヒト腸内フローラメタゲノム解析（外部プロジェクト）が行わ

れているが、そのバイオインフォマティクス解析には、腸内フローラを構成する個別菌の全ゲノム配列と機能情報が不可欠である。そこで、本菌株をプロバイオティクスとして経口投与した場合の解析の一助として、ATCC 53103株の全ゲノム解析を行った。

## 2. 方法

*L. rhamnosus* ATCC 53105株からゲノムを精製し、ホールゲノムショットガン法により全ゲノム解析を行った。その近縁種である *Lactobacillus casei* グループの中に、全ゲノム配列が公開されているものがあり、それらの菌株との比較ゲノム解析を行った。

## 3. 結果と考察

*L. rhamnosus* ATCC 53105株の染色体は3,005,051 bpで、プラスミドは保有していなかった (Fig. 1)。*Lactobacillus* 属の中では、比較的大きなゲノムサイズであり、2,836のタンパク質が推定された<sup>1)</sup>。チーズから分離され、ゲノム情報が公開されている *L. casei* ATCC 334株とは、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹のとおり、ゲノム情報からも近縁種であることが妥当であると考えられた。Kankainen *et al.*の報告した *L. rhamnosus* GG株<sup>2)</sup> と ATCC 53103株ゲノムの比較では、ATCC 53103株の方がゲノムサイズで約5 kbほどGG株より短くなっていたが、コードされている遺伝子は同じであった。なお、GG株では今まで *Lactobacillus* 属では知られていなかった線毛 (pillin) が発見されており<sup>2)</sup>、Walker<sup>3)</sup> の書いた“Probiotics stick it to the man”の中で、“ATCC 53103株にも SpaCBA線毛はあるのか?”とコメントされていたが、ATCC 53103株のゲノムにも SpaCBA線毛をコードした遺伝子は見出されている。

現在、本菌株 (ATCC 53103株=GG株) を使用した発酵乳が市販されており、そのプロバイオティクスをヒトボランティアに経口投与し、その糞便を経時的に採取している。投与前、投与中、そしてウォッシュアウトの期間を経た時期の腸内フローラのメタゲノム解析に関し、今後、本菌株のゲノム情報を利用していく。

## 4. 要約

我々は、ヒト消化管からの分離株である *L. rhamnosus* ATCC 53103株 (別名としてGG株) のゲノムを配列決定した。ATCC 53103株は、最もプロバイオティクス効果の研究されている菌株の1つである。本菌株のゲノムサイズは、3.0 Mbの染色体を有し、2,836のタンパク質をコードしていた。糖代謝・アミノ酸代謝とその輸送に係るタンパク質の他に、注目に値する防衛機構に関する遺伝子を多く保有していた。比較のゲノム分析で、広範囲なシntenニーが *L. rhamnosus* ATCC 53103株とその近縁種である *L. casei* ATCC 334株 (チーズ分離株) の間でみられた。しかし、*L. rhamnosus* ゲノムには多数の挿入、すなわち、PTS-タイプ輸送機システム、配糖体ヒドロラーゼと転写制御因子のために遺伝子から成る遺伝子群を含み、腸環境への潜在的適合性を反映していた。ATCC 53103株には多くの細胞表面付着タンパク質が予測された。さらに、そのゲノムは、付着性に対して機能的な SpaCBA線毛をコード化していた。*L. rhamnosus* ゲノムのこれらの特徴は、消化管生存に関与して、腸の粘膜と微生物叢との相互作用に貢献していると推察された。

## 文献

- 1) Morita H, Toh H, Oshima K, Murakami M, Taylor TD, Igimi S., and Hattori, M., Complete genome sequence of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *J. Bacteriol.*, 191, 7630-7631 (2009).
- 2) Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A.P., Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C., Vanderleyden, J., Hämäläinen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K.T., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjärvi, T., Auvinen, P., de Vos, W.M., Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106, 17193-17198 (2009).
- 3) Walker, A., Probiotics stick it to the man, *Nat. Rev.*, 7, 843 (2009).

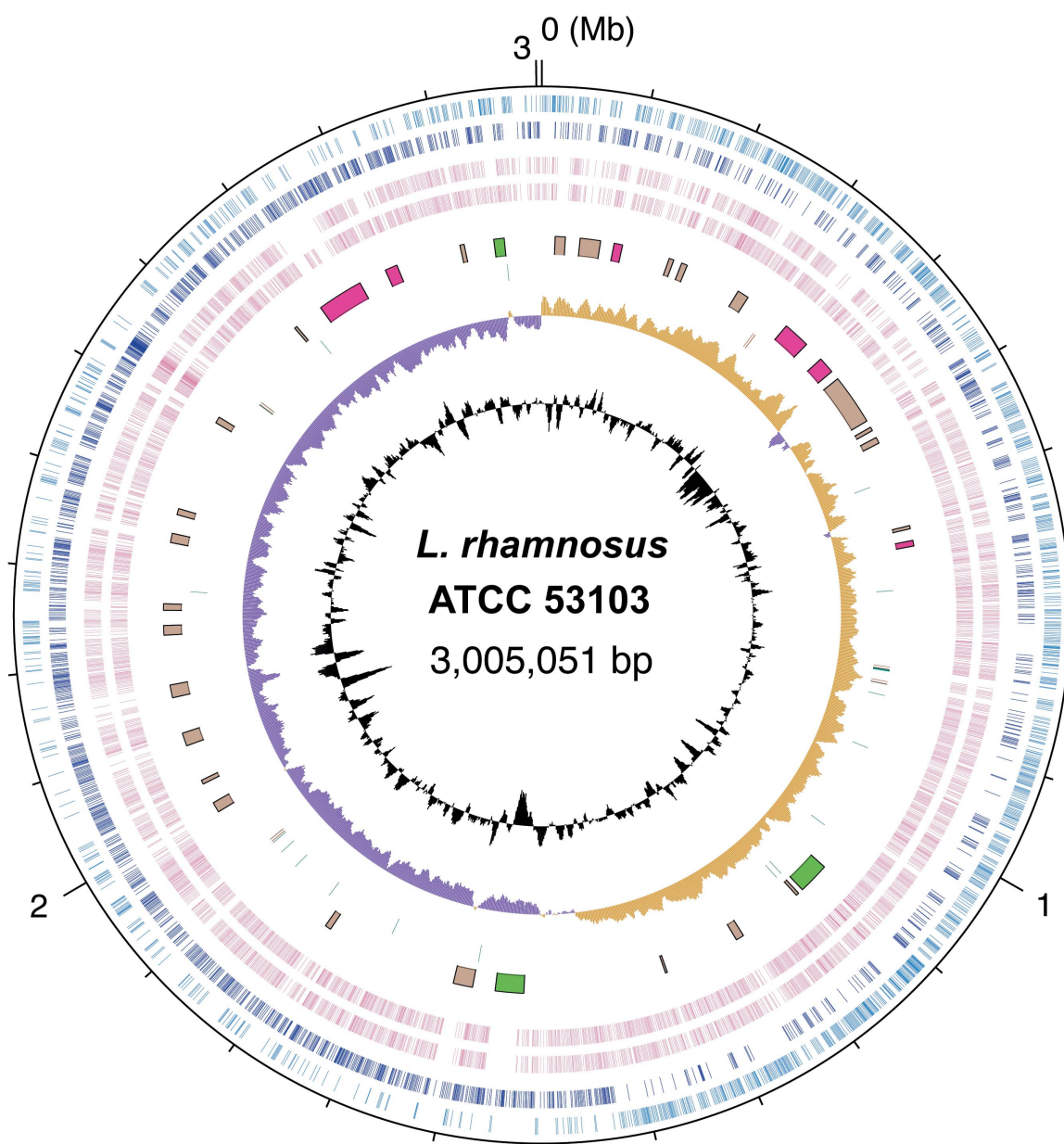


Fig. 1. Circular representation of the *L. rhamnosus* ATCC 53103 chromosome. From the outside in: circles 1 and 2 of the chromosome show the positions of protein-coding genes on the positive and negative strands, respectively. Circles 3 and 4 show the positions of protein-coding genes that have orthologs in *L. casei* ATCC 334, and *L. casei* BL23, respectively. Circle 5 shows the positions of the *L. rhamnosus* ATCC 53103-specific 34 segments: carbohydrate utilization gene clusters (pink), prophage regions (green), and the others (brown). Circle 6 shows the positions of tRNA genes (purple) and rRNA genes (brown). Circle 7 shows a plot of GC skew  $[(G - C)/(G + C)]$ ; khaki indicates values  $> 0$ ; purple indicates values  $< 0$ . Circle 8 shows a plot of G + C content (outward: higher values than the average).