

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3報—

Complete sequence, comparative genomics and post-genome analysis of lactic acid bacteria

森田英利¹, 堀川 洋¹, 鈴木武人¹, 政岡俊夫¹, 福岡秀雄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, 藤 英博⁴, 大島健志朗⁴, 芝 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, Hiroshi Horikawa¹, Tekahito Suzuki¹, Toshio Masaoka¹, Hideo Fukuoka¹, 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, Hidehiro Toh⁴, Okenshiro Oshima⁴, 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 present the complete genome sequences of two lactic acid bacteria (LAB), probiotic *Lactobacillus reuteri* (2,039,414 bp) and non-probiotic *Lactobacillus fermentum* (2,098,685 bp), which share obligately the heterofermentative property in glucose metabolism and have a phylogenetically closest relation. The two genomes are compared with each other and with other lactobacilli exhibiting facultatively heterofermentative and obligately homofermentative properties. A striking common feature of the two lactobacilli is a lack of a gene encoding 6-phosphofructokinase essential for the Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway, so that the pentose phosphate pathway is utilized in them. Furthermore, numerous mobile elements in *L. reuteri* is found in the genomes. These data imply that a genetic plasticity-environment relationship may account for the diversity between these lactobacilli.

1. 目的

Lactobacillus reuteri は G + C 含量 40 ~ 42 %, *Lactobacillus fermentum* は G + C 含量 52 ~ 54 % であるが, 分類学上の諸性状が一致している¹⁾。プロバ

イオテイクス乳酸菌として *L. reuteri* JCM1112^T, そしてその知見のほとんどみられない *L. fermentum* IFO3956 の全ゲノム配列を決定した²⁾。両菌株についてコドン使用について解析し, 他の *Lactobacillus* 属との比較ゲノム解析を行った。すでに全ゲノム配

列の公開されている *Lactobacillus* 属は、ホモ発酵型と条件的ヘテロ発酵型であり、絶対ヘテロ発酵型の *Lactobacillus* 属としては初めての全ゲノム配列決定となる。他の *Lactobacillus* 属との比較ゲノム解析から得られた知見を報告する。

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)、その他のソフトにより行った。

3. 結果と考察

本研究において対象とした *L. reuteri* と *L. fermentum* と近縁細菌について、リボゾームタンパク質のアミノ酸配列をもとに系統樹を作成した。その結果は、Fig. 1 のとおりであるが、16S rDNA 配列の系統樹と同様、*L. reuteri* と *L. fermentum* は最も近いところに位置していた。

次に、*L. reuteri* JCM1112^T と *L. fermentum* IFO3956

の全ゲノム配列を決定した。すでに全ゲノム配列の公開されている *Lactobacillus* 属は、ホモ発酵型と条件的ヘテロ発酵型であり、絶対ヘテロ発酵型の *Lactobacillus* 属としては初めての全ゲノム配列決定となる。両菌株ともプラスミドはなく、*L. reuteri* のゲノムサイズは 2,039,414 bp、*L. fermentum* のゲノムサイズは 2,098,685 bp であることが明らかになった^{2,3,4}。全ゲノム中に ORF の占める割合 (%), ORF の数, tRNA の数, rRNA operons の数などの情報は、Table 1 に示したとおりである。両菌株は非常に似たゲノム構造をとっていると考えられる。また、全ゲノムが公開されているものに *Lactobacillus plantarum* WCFS1⁵、*Lactobacillus johnsonii* NCC 533⁶、*Lactobacillus acidophilus* NCFM⁷ がある。全配列が非公開の *Lactobacillus* 属も加えて、7 菌種のゲノム構造の比較を Table 1 に示した。*Lactobacillus* 属のゲノムサイズは一般に 2Mb 前後と考えられ、条件的ヘテロ発酵型の 2 菌種が、3Mb のゲノムサイズであった。

条件的ヘテロ発酵型の *L. plantarum* では解糖系とペントースリン酸発酵系に関わるすべての遺伝子を保有しており、そのため、糖類の違いにより発酵形式を違えることが可能であった。一方、絶対ヘテロ発酵型の *L. reuteri* と *L. fermentum* では、6-phosphofructokinase 遺伝子が欠損しており、そのため

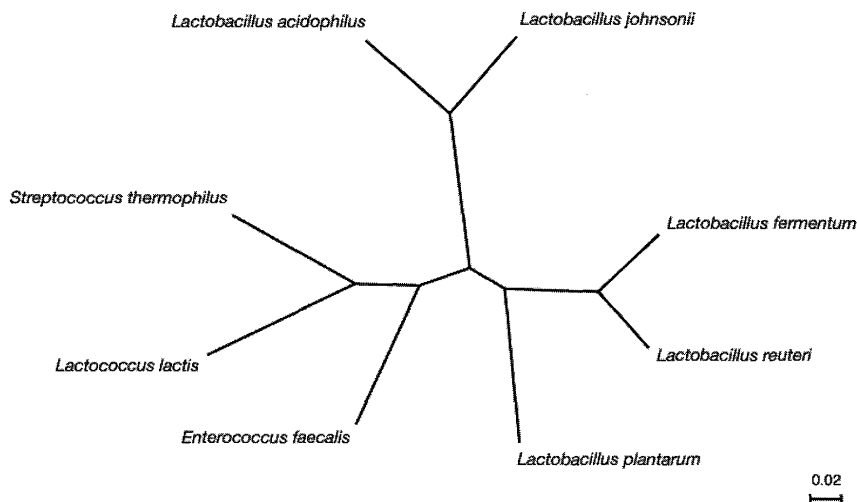


Fig. 1 Phylogenetic relationship of 8 *Lactobacillales* inferred from ribosomal protein amino acid sequences.

Concatenated amino acid sequences of 48 ribosomal proteins obtained from the eight sequenced *Lactobacillales* are aligned to measure the similarity between each species. The scale bar represents the length of the branches. Sequences were aligned with ClustalW, and an unrooted tree was generated with NJplot.

Table 1 Comparative genomics of genus *Lactobacillus*

Genus	<i>Lactobacillus</i>						
	<i>plantarum</i>	<i>johnsonii</i>	<i>acidophilus</i>	<i>casei</i>	<i>helveticus</i>	<i>reuteri</i>	<i>fermentum</i>
Species	<i>plantarum</i>	<i>johnsonii</i>	<i>acidophilus</i>	<i>casei</i>	<i>helveticus</i>	<i>reuteri</i>	<i>fermentum</i>
Strain No.	WCFS1	NCC 533	NCFM	Shirota ¹⁾	CM4 ¹⁾	JCM1112 ^T	IFO3956
Fermentative properties ²⁾	FHete	OHomo	OHomo	FHete	OHomo	OHete	OHete
Genome size (bp)	3,308,274	1,992,676	1,993,564	3,035,753	2,028,493	2,039,414	2,098,685
G+C contents (%)	45.6	34.9	34.71	46.3	37.05	38.87	51.40
Coding density (%)	84.1	89.3	87.9	---	83.57	83.6	80.4
No. of total ORFs	3,009	1,821	1,864	2,760	2,175	1,820	1,960
No. of plasmids	3 ²⁾	0	0	1 ³⁾	0	0	0
RNA No. of tRNA	62	79	61	59 ⁴⁾	64	63	54
No. of rRNA operons	5	6	4	5	5	6	5
References	2)	3)	4)	Unpublished	Unpublished	This study	This study

1) Unpublished genome data of *L. casei* Shirota and *L. helveticus* CM4.

2) Abbreviations of fermentative properties : obligately heterofermentative property; OHete, facultatively heterofermentative properties; FHete and obligately homofermentative properties; OHomo.

3) *L. plantarum* pWCFS1 possessed three kinds of plasmid, and No. of total ORFs included ORFs in the plasmids.

	Plasmid size (bp)	G+C contents (%)	No. of ORFs	Coding density (%)
pWCFS101	1,917	39.49	3	67
pWCFS102	2,365	34.33	4	57
pWCFS103	36,069	40.83	43	87

4) *L. casei* Shirota possessed one kind of plasmid and one phage, and No. of total ORFs included ORFs in the plasmids and the phage.

	Plasmids and phage size (bp)	G+C contents (%)	No. of ORFs	Coding density (%)	No. of tRNA
pLY101	66,801	43.8	66	---	0
Phage FSW	41,001	44.4	49	---	1

5) No. of tRNA in chromosome is 58.

に解糖系を利用できないことが明らかとなった。*L. reuteri*では解糖系に関わるその他すべての遺伝子は揃っており，*L. fermentum*では，もう1つの遺伝子が欠損していたが，その他の遺伝子は存在していた。発酵形式の違いは，重要な菌種の分類項目であったが，1つか2つの遺伝子の違いで表現系が大きく違っていたことがわかった。

分類学的に報告されているG+C含量はTm値などをもとに分析されているが，全ゲノム解析の結果，それぞれのG+C含量は，*L. fermentum*では51.5%，*L. reuteri*では38.9%であった（Table 1）。しかし，両菌種で分類学的な性状が一致する理由を，アミノ酸の置換は行われていないと仮定し，両菌種ともすべてのORFを抽出し，そのコドンに関わる3つの塩基をリストアップした。その結果をFig. 2に示したが，1つ目と2つ目の塩基には大きな違いがなく，コドン使用に影響しない3つ目の塩基に大きな違いがみられた。そのため，性状には大きな違いがないにもかかわらず，G+C含量が10%が明らかにされた。

L. reuteri JCM1112^Tと*L. fermentum* IFO3956には多

くのinsertion sequences (IS)があった。Table 2のとおり，*L. reuteri* JCM1112^Tでは55個，*L. fermentum* IFO3956では106個であった。全ゲノムが明らかなる*Lactobacillus*属の3菌種では完全に機能するISが15～19個であることを考えると，両菌種では非常に多いと考えられる。両菌種のISファミリーの詳細についてはTable 2に示したとおりである。*L. reuteri*には，12 group II intronsがあり，他のmobile elementとしてreverse transcriptase⁸⁾が見つかった。しかし，*L. fermentum*や他の全ゲノムが公開されている3菌種ではこれらの12 group II intronsやその他のmobile elementは存在しなかった。このことから，*L. reuteri*は，必要な場合に遺伝子構造を変化でき，結果的に環境への適合性が高くなると考えられた。

4. 要約

プロバイオティクス乳酸菌として*Lactobacillus reuteri* (2,039,414 bp)，そしてその知見のほとんどみられない*Lactobacillus fermentum* (2,098,685 bp)の全ゲノム配列を決定した。両菌種は絶対ヘテロ発酵型

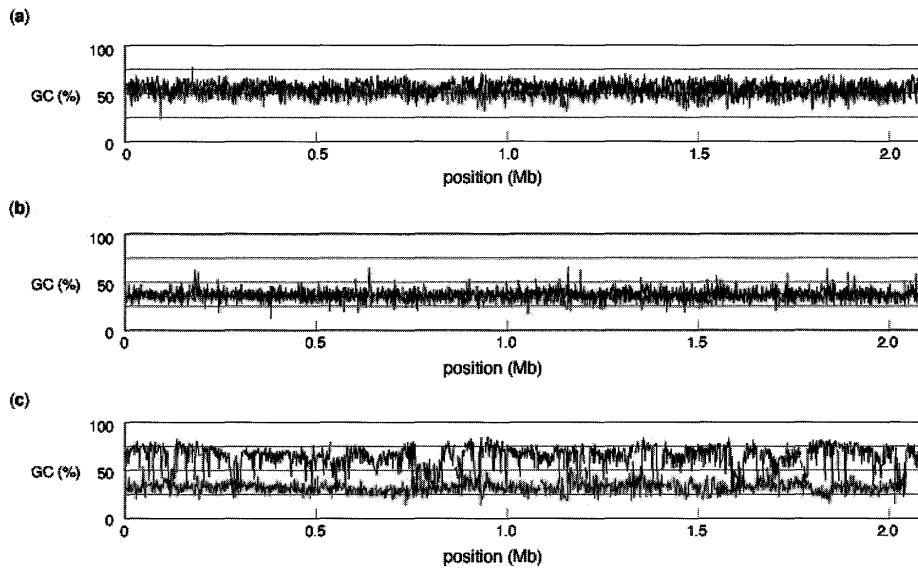


Fig. 2 Distribution of the G + C content of three codons in ORFs in *L. reuteri* and *L. fermentum* genomes. The G + C content at (a) the first codon, (b) the second codon and (c) the third codon in ORFs was plotted along the chromosomes of *LR* (red) and *LF* (blue). The regions showing irregularly low G + C content in (c) are mainly due to IS elements encoding transposase, of which the average G + C content is 44.2 % in *LF*.

Table 2 IS elements in the *L. reuteri* and *L. fermentum* genomes

IS family	No. of IS elements	
	<i>L. reuteri</i>	<i>L. fermentum</i>
IS200-IS605	24	19
IS21	3	0
IS3	8	32
IS30	6	19
IS66	7	0
ISL3	2	7
ISNCY	5	0
IS256	0	27
IS982	0	1
IS6	0	1
Total	55	106

The analysis was performed using the IS database (<http://www-is.biotoul.fr>).

の乳酸菌としては初めての全ゲノム配列決定となった。*Lactobacillus* 属には、他にホモ発酵型と条件的ヘテロ発酵型の乳酸菌があるが、上記両菌種では、解糖 (EMP) 経路では必須の 6-phosphofructokinase 遺伝子の欠損が明らかとなり、そのためペントース・リン酸経路しか機能しなかった。各 ORF 内で 3 つ目の塩基の置換が非常に多く、そのことが遺伝子

の機能は変わらず、G + C 含量に 10 % もの違いが生じることが認められた。*L. reuteri* のゲノム中で多くの mobile elements を発見したが、それは *Lactobacillus* 属が環境への適合性を高くし、生存性を有利にするのに貢献していることが示唆された。

文 献

- 1) Ennahar, S., Cai, Y. and Fujita, Y., Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 444-451 (2003).
- 2) 森田英利 (編著), 政岡俊夫, 第 4 章 プロバイオティクスとバイオジェニクスを理解するための先端科学, 第 1 節 ゲノム解析, 2 乳酸菌, p.215-226, 伊藤喜久治 編著代表, プロバイオティクスとバイオジェニクス, エヌ・ティー・エス (2005).
- 3) Morita, H., Murakami, M., Masaoka, T. et al., Gene clustering for reuterin production in the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* JCM1112^T, *Proc. Inter. Symposium: New Challenges in Functional Microbiology and Biotechnology*, 127-132, (2005).
- 4) 森田英利, 政岡俊夫, 鈴木武人, 村上 賢, 他, *Lactobacillus reuteri* JCM1112^T と *Lactobacillus fermentum* IFO3956 の比較ゲノム, *生物工学会誌*, 82, 426-427, (2004).

- 5) Kleerebezem, M. et al., Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 1990-1995 (2003).
- 6) Pridmore, R.D. et al., The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2512-2517 (2004).
- 7) Altermann, E. et al., Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 3906-3912 (2005).
- 8) Martinez-Abarca, F. and Toro, N., Group II introns in the bacterial world. Mol. Microbiol. 38, 917-926 (2000).