

サラブレッドとヒト腸管由来 *Lactobacillus* 属の 比較ゲノム解析

*Comparative genomics of Lactobacillus originated from intestines of thoroughbred and human
by mutation mapping*

森田英利, 村上 賢, 滝沢達也, 池田輝雄, 加藤行男, Okatani, A. T.

麻布大学獣医学部

Hidetoshi Morita, Masaru Murakami, Tatsuya Takizawa, Teruo Ikeda, Yukio Kato and Alexandre T. Okatani

School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. Twenty one species of *Lactobacillus* were isolated from intestines of eleven thoroughbreds. Sixteen species belonged to genus *Lactobacillus* and five strains might be new species candidates. *Lactobacillus-Pediococcus-Paralactobacillus* is grouped seventeen groups by the phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence analysis. The twenty one species belonged to five of seventeen groups of *Lactobacillus*. The genome structure of *L. reuteri* KK18 from thoroughbred intestine was compared with that of *L. reuteri* JCM 1112 from human intestine by mutation mapping based on the information of the *L. reuteri* JCM 1112 complete genome. *L. reuteri* JCM 1112 possesses 1,820 ORFs in its complete genome, and 278 ORFs of *L. reuteri* KK18 ORF were estimated by differing from those of *L. reuteri* JCM 1112.

1. 目的

哺乳動物の消化管を含め様々な環境から *Lactobacillus* 属細菌は分離され、2007年4月の段階で120菌種が報告されている。その後、PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed&cmd=search&term=>) で検索すると新たに5菌種の登録がなされている。*Lactobacillus* 属は、発酵食品の製造、健常な生物の腸内フローラの形成およびプロバイオティクスの観点からも重要な細菌群と考えられている。*Lactobacillus* 属の消化管細胞への付着性については、宿主特異性が高いことが知られるも、それは菌種レベルではなく菌株レベルで性状が大きく異なるからである。同菌種内の菌株間での付着性などの性状も徐々に解明されてきた部分もあるが、付

着メカニズムや分子レベルでは不明な点も多い。そこで、分離源の異なる同菌種の菌株間のゲノムレベルでの網羅的な解析は興味深い点である。

サラブレッドの糞便中には、*Lactobacillus* 属は 10^8 CFU/g の菌数が一般的であると確認されており¹⁾、本研究では1生物種（サラブレッド）の消化管から生菌として分離された *Lactobacillus* 属の系統分析と、分離源の異なる *L. reuteri* について、random amplified poly-morphic DNA (RAPD) 法と、タイリングアレイを用い“mutation mapping”による比較ゲノム解析を行った。

2. 方法

BL寒天培地とLBS寒天培地を用いて、11頭のサラブレッドの新鮮な糞便から *Lactobacillus* 属を含む

細菌を嫌気培養によって分離した。分離した菌株は、生化学的性状、16S rRNA 遺伝子配列解析および DNA-DNA ハイブリダイゼーション法などにより同定した。分離された *Lactobacillus* 属については系統樹を作製し、その分布について検討した。

L. reuteri は、哺乳動物の消化管から主に分離され、それ以外の分離源はほとんど知られていない。サラブレッドの消化管から分離された4株の *L. reuteri* (PS30, NM39, HU5, KK18) の16S rRNA 遺伝子配列の系統樹を作製し、その中から KK18 および分離源の異なる *L. reuteri* JCM 1081 と JCM 1084 (ニワトリの消化管由来株)、JCM 1112 (ヒトの消化管由来株) について、3つのプライマーによる RAPD によるタイピングを行った²⁾。そして、*L. reuteri* JCM 1112^T の全ゲノム情報によりタイリングアレイを作製し、ウマ消化管から分離された *L. reuteri* KK18 について mutation mapping を行った。mutation mapping の作業内容としては、1) バックグラウンド閾値の算出、2) ORF 内のバックグラウンド閾値以下の probe 数算出、3) deletion している ORF の決定、をおこなった。次に、deletion している ORF の決定については、各 ORF 領域に含まれる deletion 候補プローブの割合を算出した (deletion 候補プローブ数/全プローブ数)。この deletion 候補プローブ割合について、(平均値 + 1.5 × 標準偏差) を閾値とし、それ以上の deletion 候補プローブ割合をもつ ORF は、ゲノム情報のある菌株に対して、被検菌のゲノム上では deletion している ORF とした。

3. 結果と考察

各種哺乳動物の消化管から分離された *Lactobacillus* 属については、1995年に光岡がまとめた報告があり、その後の文献により補正したとしても、ヒトから分離の12菌種(そのうち2菌種は旧分類)が最も多かった。それは、最もよく研究されていることも1つの要因かと思われる。本研究では、2種類の選択培地から合計150余株を分離し、同定した結果、その95%以上が *Lactobacillus* 属であった。その菌種の内訳は、既知の菌種が16菌種でヒトの消化管から分離される菌種より多かった。16S rRNA 遺伝子配列の1,400 bp 以上の系統樹から *Lactobacillus* 属に分類されると思われる5つの新菌種が分離され

ていた。16S rRNA 遺伝子配列と近縁種との DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果、その5つは新菌種と示唆された。その内の1菌種は、*Lactobacillus hayakitensis* として Int. J. Syst. Evol. Microbiol. に論文投稿を完了した³⁾。その他の4菌株については、同定試験中もしくは投稿中である。

16S rRNA 遺伝子配列に基づいて *Lactobacillus-Pediococcus-Paralactobacillus* 属は17グループに分類されているが⁴⁾、本研究での既知の16菌種の分布は、5つのグループ—*L. delbrueckii* group (既知3種)、*L. salivarius* group (既知5種)、*L. reuteri* group (既知6種)、*L. buchneri* group (既知1種)、*L. vitulinus* group (既知1種)—に集中していた (Fig. 1)。サラブレッド消化管に常在する *Lactobacillus* 属の菌種は多いものの、比較的的近縁であった。これは、草食動物という雑食と比べると偏った食餌、宿主が遺伝的に非常に近いことなどの影響が示唆される。

Fig. 2 のとおり、別々の馬から分離された4株の *L. reuteri* (PS30, NM39, HU5, KK18) とヒト消化管から分離された *L. reuteri* JCM 1112 の16S rRNA 遺伝子配列をもとに系統樹を作製した。PS30, NM39, HU5 は日本で生まれた馬であり、1つのクラスターを形成していた。16S rRNA 遺伝子配列の系統樹からは、米国で受胎し、日本で生産された馬由来の KK18 は上記3株とは違うクラスターを形成していた。*L. reuteri* KK18, JCM 1081, JCM 1084, JCM 1112 について、3つのプライマーによる RAPD を行った。3つのプライマーのバンドパターンを総合して考えると、どの菌株もゲノムの構造は異なっていた。

本研究では、JCM 1112 の全ゲノム情報に対して、KK18 のゲノムを mutation mapping に供した。Fig. 3 に示したが、threshold が0.84 以上の場合に deletion している ORF とした。*L. reuteri* JCM 1112 の全ゲノム上には1,820 の ORF を検出しており、上記算出アルゴリズムでは、KK18 の全ゲノム上で deletion している ORF の数は278 と算出した。分離源 (生育環境の違い) が遺伝子配列のレベルで、15% の違いを生じていた。哺乳動物の消化管から分離という共通点があっても、食餌や消化管の糖鎖構造の違いは明らかであり、違う生物種の消化管で定着するために、細菌のゲノム構造が変化し、作られるタンパク質に

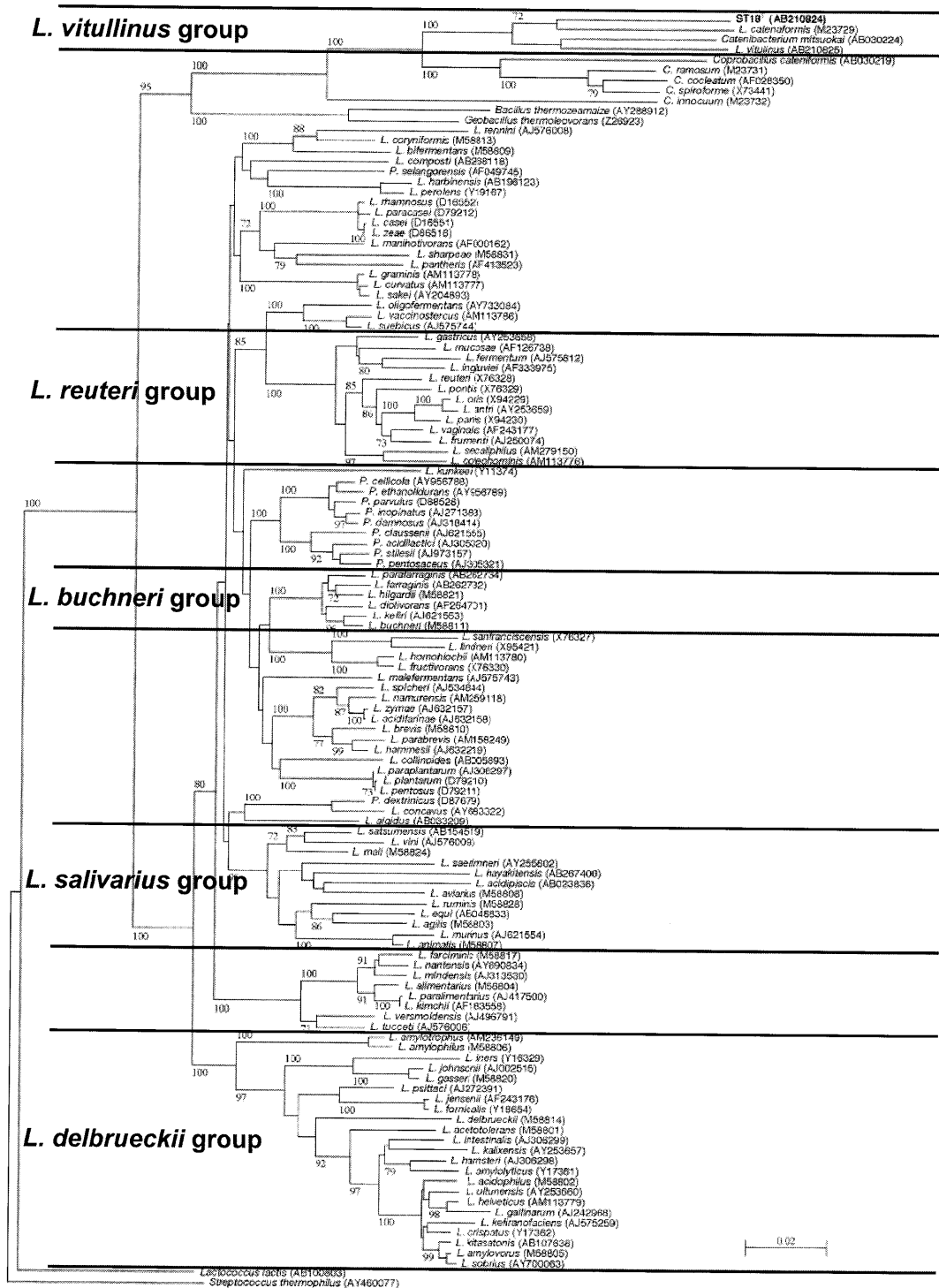


Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence analysis depicting the phylogenetic relationships among species of the genera *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Paralactobacillus*. The phylogenetic distance between taxa is given by the sum of horizontal branch lengths. Bar indicates number of nucleotide substitution per site. Different trees have been obtained as follows: sequences have been aligned with Clustal x. Statistical support of the clades has been estimated with bootstrap (1,000 replicates).

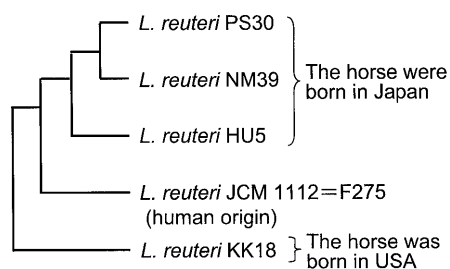


Fig. 2 Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence analysis depicting the phylogenetic relationships between four and one strains from horse and human intestines of *Lactobacillus reuteri*, respectively. Different trees have been obtained as follows: sequences have been aligned with Clustal w.

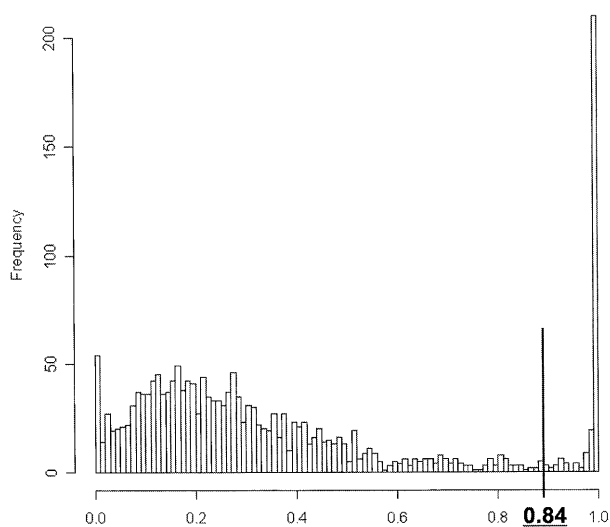


Fig. 3 Detection of putative deleted ORFs by the mutation mapping between *L. reuteri* JCM 1112 vs. *L. reuteri* KK 18.

影響するものと推察された。

4. 要約

11頭のサラブレッドの消化管から21菌種の *Lactobacillus* 属を分離し、16菌種は既知の菌種で、その他の5つは新菌種候補であった。 *Lactobacillus-Pediococcus-Paralactobacillus* 属は16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹から17グループに分類されており、その21菌種は5つのグループに属した。 *L. reuteri* JCM 1112の全ゲノム情報により、サラブレッド消化管から分離された *L. reuteri* KK18について mutation mapping を行った。 *L. reuteri* JCM 1112の全ゲノム上には1,820のORFを検出しており、 *L. reuteri* KK18の全ゲノム上で deletion しているORFの数は278と算出した。

文献

- 1) Endo A, Okada S and Morita H, Molecular profiling of *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Bifidobacterium* species in feces of active racehorses, J. Gen. Appl. Microbiol., 53: 191-200 (2007).
- 2) Endo A and Okada S, *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57: 708-712 (2007).
- 3) Morita H, Shiratori C, Murakami M, Takami H, Kato Y, Endo A, Nakajima F, Takagi M, Akita H, Okada S and Masaoka T, *Lactobacillus hayakitensis* sp. nov., isolated from intestines of healthy thoroughbreds, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57: 2836-2839 (2007).
- 4) Felis GE and Dellaglio F, Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria, Curr. Issues Intestinal Microbiol. 8: 44-61 (2007).