

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4報—

Complete sequence, comparative genomics and post-genome analysis of lactic acid bacteria
— No. 4 —

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

¹麻布大学獣医学部, ²北里大学理学部, ³麻布大学健康環境科学部,

⁴(財)山形県企業振興公社生物ラジカル研究所, ⁵東京大学大学院新領域創成科学研究科

Hidetoshi Morita¹, Hidehiro Toh², Okenshiro Oshima², 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 Fukuyama³, Seigo Kishikawa³, Shin Hisamatsu³, Tetsuhiko Yoshimura⁴, Tadayoshi Shiba² and Masahira Hattori⁵

¹ School of Veterinary Medicine, Azabu University, ² School of Science, Kitasato University,

³ School of Environmental Health Sciences, Azabu University,

⁴ Institute for Life Support Technology, Yamagata Public Corporation for the Development of Industry,

⁵ Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo

Abstract. We determined the complete genome sequences of *Lactobacillus reuteri* JCM 1112^T, *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, *Lactococcus garvieae* (a toxic strain for yellowtail), *Lactococcus garvieae* (a non-toxic strain for yellowtail) and *Lactobacillus rhamnosus*. The genome analysis of *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium catenulatum* is on going. Probiotics are live microorganisms that confer health benefits on the host. The probiotic *L. reuteri* and non-probiotic *L. fermentum* are phylogenetically closest to *L. reuteri* in the *Lactobacillus*. To elucidate the molecular basis on the probiotic property exhibited by *L. reuteri*, comparative analysis of both genomes showed that *L. reuteri* harbored the unique 48 kb genomic island containing the genes necessary for the biosynthesis of a reactive 3-hydroxypropionaldehyde (reuterin), which may influence the microflora balance in the gut. We identified three genes (LR1633-LR1635) with a glycerol dehydratase subunit motif (PFAM PF02286-PF02288) in the *L. reuteri* genome. These genes are designated *gupCDE* (glycerol utilizing enzymes) in this study. The *gupCDE* knock-out *L. reuteri* (*L. reuteri* Δ *gupCDE*) was obtained, and the reuterin synthesis will be conducted by glycerol dehydratase in the glycerol metabolism *in vivo* by the gnotobiotic mice mono-associated with *L. reuteri* and *L. reuteri* Δ *gupCDE*.

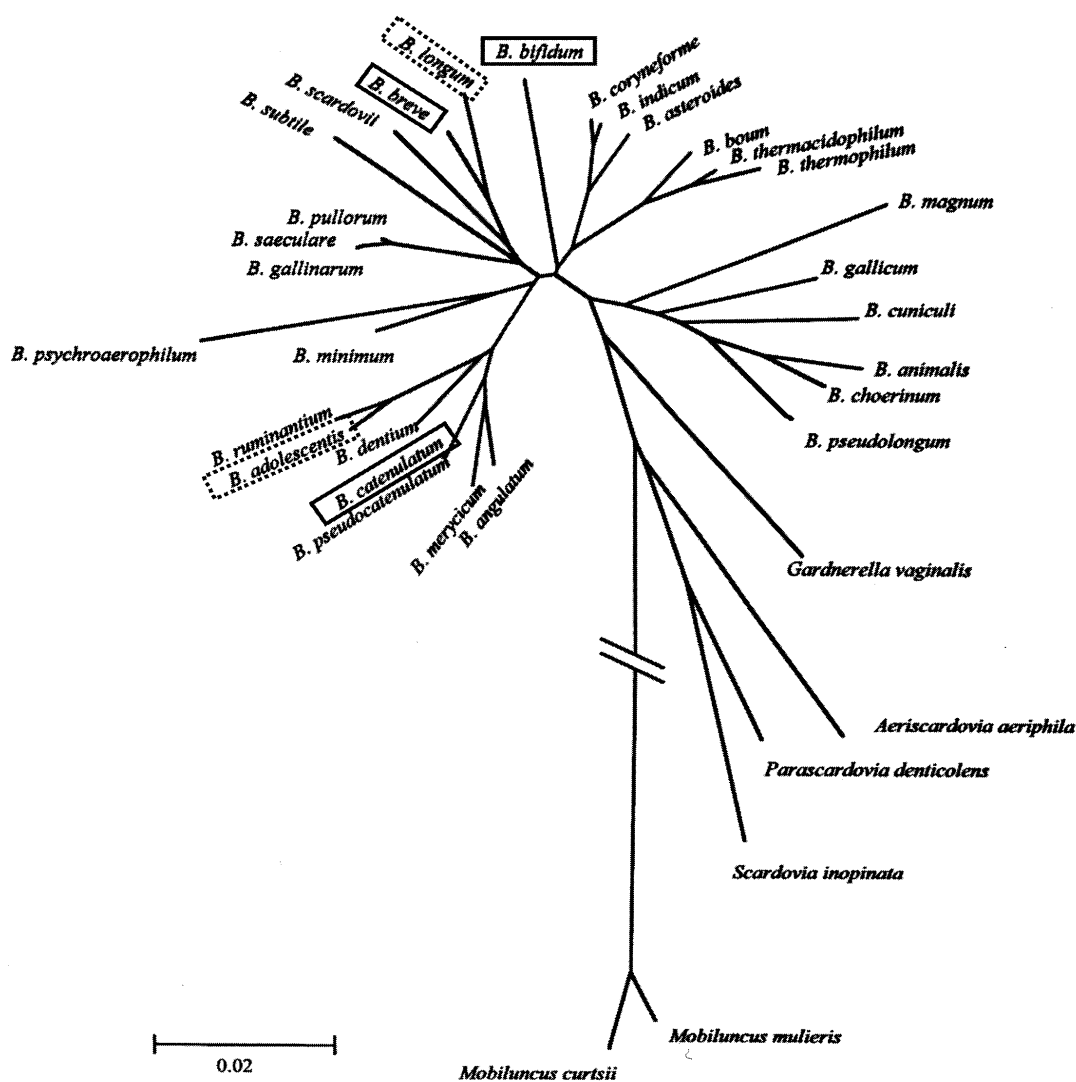


Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence analysis, depicting the phylogenetic relationship among species of the genus *Bifidobacterium*. The tree is representative of different trees obtained with distance matrix and maximum likelihood analysis. Bar indicates number of nucleotide substitution per site.

bifidobacteriaの中から菌種を選択して、全ゲノム解析を行った。そのゲノム配列から、その菌株のもつ性状や機能を明らかにすることを目的とする。

一方、*Lactobacillus reuteri* JCM 1112^Tと*Lactobacillus fermentum* IFO 3956については、比較ゲノム解析からオルソログはほとんど共通していた。しかし、*L. reuteri* JCM 1112^Tにおいてのみ、グリセロールから抗菌性物質であるロイテリン産生系はオペロンの²⁾にコードされていることを確認した。*Salmonella enterica*²⁾ではglycerolを代謝するとdehydratase活性が1度で不活化するのに対し、*L. reuteri*では、glycerolを連続代謝しても

dehydratase活性が維持される。そこで*L. reuteri*のglycerol dehydratase遺伝子(EC.4.2.1.30)は、本研究ではと区別して

gucCDE

(glycerol utilizing enzyme in *pdu* operon)と命名し、*L. reuteri* JCM 1112^Tの

gucCDE

遺伝子破壊株(*L. reuteri* Δ *gucCDE*)を作出した。

2. 方法

2006年11月現在、全ゲノム情報が公開されているlactobacilliとbifidobacteriaをTable 1にまとめた。本プロジェクトでは、それ以外の菌種を選択しそれらの全ゲノム解析を進めた。

Table 1 Complete genome sequence of lactobacilli, lactococci and bifidobacteria

Species	Strain	Accession No.	Reference
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	AL935263	5
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NCC533	AE017198	6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCFM	CP000033	7
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	23K	CR936503	8
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC11842	CR954253	9
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	UCC118	CP000233	10
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC BAA-365	CP000412.1	11
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 33323	CP000413.1	11
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC 367	CP000416.1	11
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334	CP000423.1	11
<i>Lactobacillus reuteri</i>	JCM 1112 ^T	(finishing)	This study
<i>Lactobacillus fermentum</i>	IFO 3956	(finishing)	This study
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	---	(finishing)	This study
<hr/>			
<i>Lactococcus garvieae</i> (non-toxic strain for yellowtail)	---	(finishing)	This study
<i>Lactococcus garvieae</i> (toxic strain for yellowtail)	---	(finishing)	This study
<hr/>			
<i>Bifidobacterium longum</i>	NCC2705	AE014295	12
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC 15703	AP009256	In press**)
<i>Bifidobacterium breve</i>	---	(on going)	This study
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	---	(on going)	This study
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	---	(on going)	This study

*) Including on going project.

***) Suzuki, *et al.* of Gifu University, personal communication.

供試菌株の染色体DNAを精製後，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シーケンサー（Amersham Biosciences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）などのソフトにより行った。

*L. reuteri*のglycerol dehydratase活性は，Yamanishi *et al.*³⁾の方法で測定した。また，pIL253のエリスロマイシン遺伝子を用いたdouble crossoverのシステム⁴⁾により*L. reuteri* Δ gupCDEを作出し，得られた形質転換体が，PCR法とロイテリン産生能により*L. reuteri* Δ gupCDE株であることを確認した。

3. 結果と考察

Table 1のとおり，本プロジェクトでは，*L. reuteri* JCM 1112^T，*L. fermentum* IFO 3956，*Lactococcus garvieae*（プリに対する毒性株），*Lactococcus garvieae*（プリに対する無毒株）および*Lactobacillus rhamnosus*の全ゲノム解析を完了した。*L. reuteri*

JCM 1112^Tと*L. fermentum* IFO 3956はデータベースに登録を完了し，他の3菌株については，アノテーション（遺伝子推定）している状況である。そして，*Bifidobacterium breve*，*Bifidobacterium bifidum*，*Bifidobacterium catenulatum*については，ゲノム解析中である。

L. reuteri JCM 1112^Tと*L. fermentum* IFO 3956のゲノム解析をした理由は，*L. reuteri* JCM 1112^Tのもつプロバイオティクス効果を明らかにすることである。*L. reuteri* JCM 1112^TのORFs数は1,820であり，そのほとんどは*L. fermentum* IFO 3956のオルソログと一致した。両者の違いは，*L. reuteri* JCM 1112^Tのみ，ロイテリン合成系（pduオペロン），ビタミンB₁₂合成系（cob/cbi/hemオペロン），免疫賦活に関与すると思われるdlt遺伝子群，そして付着因子のcell wall binding repeat（CWBR）を6つ有することであった。

Table 2に，glycerol dehydratase活性を測定した結果を示した。*L. reuteri* JCM 1112^Tの菌体破砕液では250 unit/wet gであった。そして，gupC，gupD，gupEそしてgupCDEをクローニングし*E. coli*に導入，glycerol dehydratase活性を測定したところ，

Table 2 The glycerol dehydratase activity in *E. coli* of DNA cloned from *L. reuteri* JCM 1112^T

Cell extract	Insert DNA ^a	Recipient	Medium	Glycerol dehydratase activity (units / wet g) ^b
Control	No insert	BL21 (DE3) RIL	LB broth	< 0.1
Clone 1	<i>gupCDE</i> of <i>L. reuteri</i>	BL21 (DE3) RIL	LB broth	4.97 ± 1.11
Clone 2	<i>gupC</i> of <i>L. reuteri</i>	BL21 (DE3) RIL	LB broth	< 0.1
Clone 3	<i>gupD</i> of <i>L. reuteri</i>	BL21 (DE3) RIL	LB broth	< 0.1
Clone 4	<i>gupE</i> of <i>L. reuteri</i>	BL21 (DE3) RIL	LB broth	< 0.1
<i>L. reuteri</i>	—	—	MRS broth	250

- a) The recombinant plasmid was constructed by cloning the fragments amplified by PCR from *L. reuteri* JCM 1112^T genomic DNA into a vector pET101/D-TOPO (Invitrogen Co.), and the insert was confirmed by DNA sequencing. The cloning step was performed in Chemically Competent *E. coli* TOP10 (Invitrogen Co.) and the expression experiments were conducted in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Competent Cells (Stratagene Co.) in the presence of isopropyl 1-thio-β-D-galactoside (IPTG).
- b) The cell extracts were prepared in a total volume of 1.0 ml solution containing 0.2 M glycerol 0.05 M KCl, 0.035 M phosphor-potassium buffer (pH 8.0) and 15 μM adenosylcobalamine. The dehydratase activity was determined at 37°C for 10 min by the 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone (MBTH) method by Yamanishi et al. [2]. The activity of all clones was obtained from the same experiments performed 3 times. All experiments were performed using the DNA cloned in pET101 except the experiment for *L. reuteri* JCM 1112^T.

gupC, *gupD*, *gupE*には glycerol dehydratase 活性が認められなかった。そして、*gupCDE*をクローニングした場合のみ、glycerol dehydratase 活性を確認した。すなわち、glycerol dehydratase 活性は、3つのたんぱく質で機能していること、そして分子量の測定から、3つのたんぱく質が各2量体で構築された酵素(たんぱく質)であることが推定された。

次に、double crossoverのシステム⁴⁾、すなわち、連続した*gupCDE*遺伝子配列+その両端約2 kbの配列を、*E. coli*で複製可能なベクターにクローニングした。そして、*gupCDE*遺伝子配列の中に、lactobacilliで機能するエリスロマイシン耐性遺伝子を組み込んだ。この構築プラスミドで、*L. reuteri*を形質転換し、エリスロマイシン耐性株を得た。

single crossoverでも、エリスロマイシン耐性は機能するが、*gupCED*遺伝子は破壊されていない。そこで、Fig. 3には、PCRにより single crossover株か、double crossover株かを確認したアガロースゲル電気泳動図を示した。DNA配列より single crossoverの場合は、PCR増幅により15,366 bp, 7,555 bp, 5,138 bpの3本のバンドが現れる。その形質転換体を、液体培地で数回の継代後、再度PCRで確認した。この継代株からは、PCR増幅で5,138 bpの1本のバンドし

か見られなくなった。このことから、double crossoverの現象が起こり*L. reuteri* Δ*gupCDE*株の候補であることが認められた。

次に、Δ*gupCDE*のPCR産物である5,138 bp断片を*Hind* IIIで消化した場合、切断部位がないので5,138 bpのままであるが、*EcoR* Iで消化した場合は、2,329 bp, 1,632 bp, 1,177 bpの3本のバンドに切断される。Fig. 4の右側には*Hind* IIIで消化したPCR断片、左側には*EcoR* Iで消化したPCR断片のアガロースゲル電気泳動図を示した。得られたPCR産物は*Hind* IIIで消化できないことが認められ、*EcoR* Iで消化した場合は6本のバンドが検出された(Fig. 4の左側)。未消化の断片を含んでいるが、6本のバンドの中に2,329 bp, 1,632 bp, 1,177 bpの断片を確認できるので、*L. reuteri* Δ*gupCDE*株が得られていた。*L. reuteri* Δ*gupCDE*株は3つの菌株を得て、それぞれの培養液中のロイテリン量を確認したが、すべての菌株でロイテリンはまったく産生されなかった。今後、この遺伝子破壊株のノトバイオート(モノアイソレート)マウスを作出し、プロバイオティクス効果の*in vivo*での解明を予定している。

lactobacilliとbifidobacteriaのゲノム解析が進む理由は、①工業上の利用性を高めるためにlactobacilliと

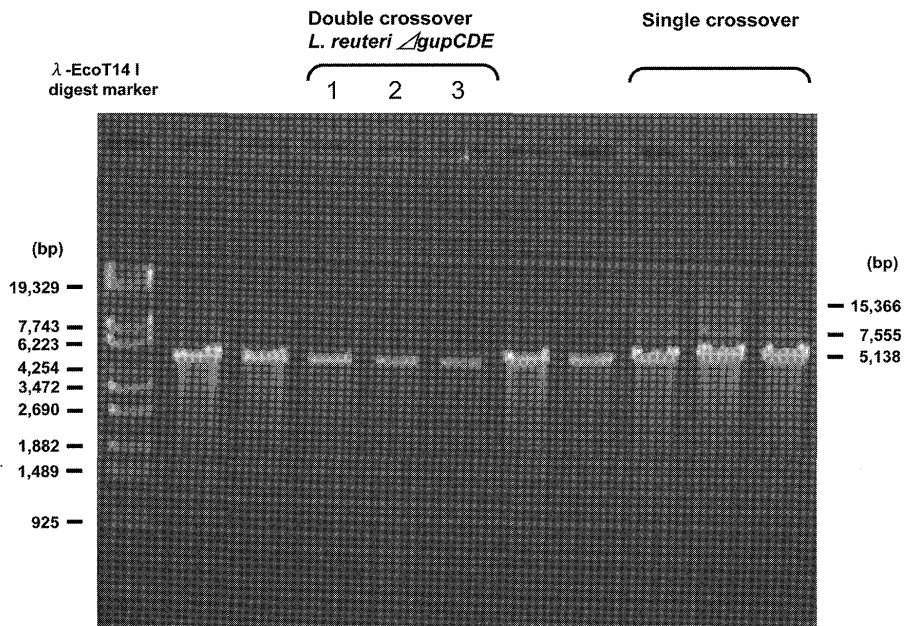


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products of *gupCDE* gene in *L. reuteri* genome for elucidating a double-crossover event of a integration system.

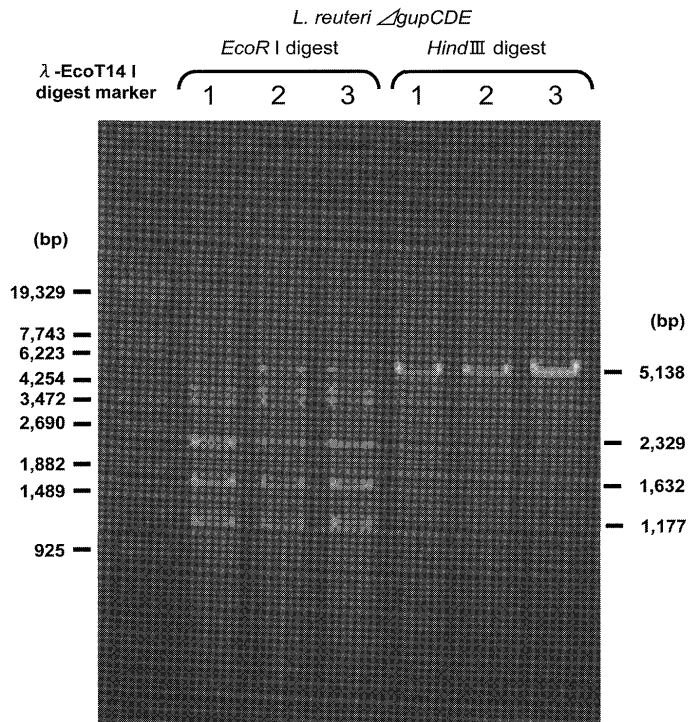


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of *EcoR* I or *Hind* III digested PCR products of Δ gupCDE gene in *L. reuteri* genome.

bifidobacteria の培養条件や生態を解明するため，② lactobacilli と bifidobacteria が安全である証明のため，③ lactobacilli と bifidobacteria の有用機能を明確にし，ニュートリゲノミクスに対する乳酸菌側のゲノム情

報提供のためである¹³⁾。今後，lactobacilli と bifidobacteria のゲノム情報は，プロバイオティクスを科学的に証明していく上で，有効な基礎的知見になると考えられる。

4. 要約

我々は, *Lactobacillus reuteri* JCM 1112^T, *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, *Lactococcus garvieae* (ブリに対する毒性株), *Lactococcus garvieae* (ブリに対する無毒株) および *Lactobacillus rhamnosus* の全ゲノム解析を完了した。そして, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* および *Bifidobacterium catenulatum* については, 全ゲノム配列を決定中である。プロバイオティクスとは, “宿主の健康に対して貢献する生きた微生物” と定義付けられている。本プロジェクトでは, *L. reuteri* のプロバイオティクス効果を分子レベルで解明することを目的としている。そこで, 分類学的に *L. reuteri* と近縁であるにもかかわらず, プロバイオティクス効果のほとんど認められない *L. fermentum* についても全ゲノム解析を行った。両菌種の比較ゲノム解析の結果, *L. reuteri* のゲノムには, 抗菌物質であるロイテリン合成系にかかわる遺伝子の 48 kb の “genomic island” を有しており, 哺乳動物の腸内フローラバランスに良い影響を及ぼしていると推察された。我々は, glycerol dehydratase subunit motif (PFAM PF02286-PF02288) として, *L. reuteri* ゲノムに3つの遺伝子 (LR1633-LR1635) を検出し, *gupCDE* (glycerol utilizing enzymes) と命名した。本研究では, その *gupCDE* 遺伝子破壊候補株 (*L. reuteri* Δ *gupCDE*) を得て, PCR 解析や glycerol dehydratase 酵素活性などから, *L. reuteri* Δ *gupCDE* を認めた。今後, 親株 (*L. reuteri* JCM 1112^T 株) と *L. reuteri* Δ *gupCDE* のそれぞれノトバイオート (モノアイソレート) マウスを解析して, プロバイオティクス効果を明らかにしていく予定である。

文献

- 1) Dellaglio, F. and Felis, G.E., Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria, in Probiotics & Prebiotics: Scientific Aspects, edited by Tannock, G. W., p.25-p.49, Caister Academic Press, Norfolk, UK (2005).
- 2) McClelland, M. et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature 413, 852-856 (2001).
- 3) Yamanishi M. et al., The crystal structure of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase in complex with cobalamin and propane-1,2-diol. Eur. J. Biochem., 269, 4484-4494 (2002).
- 4) Sasaki Y, Ito Y, Sasaki T., ThyA as a selection marker in construction of food-grade host-vector and integration systems for *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 70, 1858-64 (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) Chaillou, S. et al. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. Nat. Biotechnol. 23, 1527-1533 (2005).
- 9) van de Guchte, M. et al. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 103, 9274-9279 (2006).
- 10) Claesson, M.J. et al. Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 6718-6723 (2006).
- 11) Makarova, K. et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 15611-15616 (2006).
- 12) Schell, M.A. et al., The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 14422-14427 (2002).
- 13) 森田英利, 乳酸菌のゲノム解析について, (社)全国はっ酵乳乳酸菌飲料協会ホームページ, <http://www.nyusankin.or.jp/>