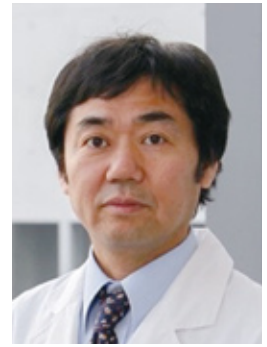


乳酸菌研究の最前線

乳酸菌・ビフィズス菌のゲノム解析の現状と応用



麻布大学 獣医学部 動物応用科学科 食品科学研究室
教授 森田 英利

1. はじめに

乳酸菌として初めて全ゲノム解析が公表されたのは、2001年の*Lactococcus lactis*¹⁾であり、*Lactobacillus*属で最初の報告は、2003年の*Lactobacillus plantarum*²⁾である。一方、ビフィズス菌では、*Bifidobacterium longum*³⁾の全ゲノム解析の論文が2002年に初めて公表された。それから10年以上が経過した現在、数多くの属、種、そして菌株の異なる乳酸菌とビフィズス菌のゲノム情報が公開されてきた。その背景には、高速シーケンサーの登場とその後の性能アップが重要な役割を果たした。それによって、近縁間での比較ゲノム解析が可能となり、ゲノム構造の基本情報(組換え、IS、配列の欠失、水平伝播、ファージなど)、代謝系、細胞付着性、感染防御や免疫賦活効果なども含めた機能性の解明に非常に貢献してきた。

無菌マウスを用いた腸管出血性大腸菌O157感染死モデルにおける*B. longum*のO157感染死の予防効果の作用機序解明の一助として、供試したビフィズス菌すべての全ゲノム配列を比較することでフルクトース(果糖)トランスポーター遺伝子の有無の違いを見出した。このフルクトース代謝によって産生される酢酸が、O157感染死を予防するプロバイオティクス効果の作用機序であることが明らかにされた⁴⁾。

1990年代の後半から、細菌の全ゲノム情報から基礎研究を進める体制に対して“パラダイムシフト”という言葉が使われることに共感した。最

近の“Nature Review Microbiology”に、この10年間におけるシーケンス技術と細菌ゲノム研究の進展⁵⁾についてreviewされているので参照されたいが、乳酸菌の範疇でも*Lactobacillus rhamnosus*の100株の比較ゲノム解析が1つの論文で報告され、1990年代の後半によく耳にした“パラダイムシフト”という段階から、さらに次のステージに入った印象を受ける。1株のcompleteのゲノム配列があれば、同種の他の菌株はdraft配列をそのcomplete配列にマッピングすることにより、代謝、アンタゴニスト、シグナル、機能的特性に至るまで詳細な比較ゲノム解析できる⁶⁾。draft配列では、ある遺伝子が存在しないことの証明はできないが、同種のcomplete配列があれば、バイオインフォマティクス的にはdraft配列も十分に解析に寄与する。なお、実際のdraft配列の様子を見ると、ギャップ(gap)になるのはIS、TnやリボソームRNA遺伝領域であり、ORFについてはほぼカバーできているのが現状である。

乳酸菌とビフィズス菌の全ゲノム解析により、様々なことが明らかになってきたが、ここでは、以下の2つの項目について述べる。

2. 乳酸菌・ビフィズス菌における全ゲノム解析情報からの知見

従来、乳酸菌やビフィズス菌には“線毛(pili)がない”という認識があった。これは、集菌作業の遠心分離で線毛が脱落し易く確認し難かったこと、従来から乳酸菌に線毛がないという先入観か

ら、乳酸菌やビフィズス菌の線毛の発見は遅れることとなった。それが一転して、全ゲノム解析から得られた情報によって“線毛があるはず”ということによって仕事はなされたのである。

(1) 乳酸菌からの線毛の発見

*Lactobacillus casei*グループのゲノム解析により、*spaCBA*がコードするのは菌体表層タンパク質であるが機能不明とアノテーションされていた。その後、*Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) 株のゲノム解析^{7, 8)}およびその後の詳細な機能学的・形態学的な研究^{9, 10)}により、SpaCBAは線毛タンパク質であり付着性に関与していることが明らかにされた。グラム陽性細菌の表層タンパク質の中には、C末端領域に共通してLPXTG配列を保有し、本配列を介して細胞壁に共有結合する細胞壁結合タンパク質(CWAP: cell-wall-anchored protein)が存在する。CWAPは、宿主組織への付着や宿主細胞への侵入などに密接に関与し、CWAPと細胞壁との結合はsortaseと命名された酵素に媒介されている。CWAPは、*Staphylococcus aureus*表層に提示される過程で、sortaseによるLPXTG配列の特異的切断を受け、生じたポリペプチド末端がペプチドグリカンにア

ミド結合することで、細胞壁に配置固定されることが示されている^{11, 12)}。*L. rhamnosus* GG株のSpaCBAにはLPXTG配列があり、sortaseもコードされているのでこのCWAP配置固定機構が機能している。すなわち、従来から知られていた*L. rhamnosus* GG株の非常に強い付着性の機序は、線毛のadhesionによるものであった。

では、“乳酸菌には線毛がある”と言っていいかということ、そうではないようだ。乳酸菌の範疇のゲノム情報も増えているがゲノム既知の情報に基づく、*Lactobacillus*属で*spaCBA*を有するのは*L. casei*グループのみであり、線毛を有する乳酸菌は*L. casei*グループの特徴である¹³⁾。これは、*Lactobacillus*属の中で、*L. casei*グループが分化した後、*spaCBA*遺伝子が水平伝播して*L. casei*グループゲノムに入り込み、その後、種の分化が起きて*L. casei*グループに特異的な遺伝子群になったと推察される。また、*L. casei*グループのSpaCBA(線毛)などの菌体表層タンパク質の有無は菌種特異的というより、生育環境(哺乳動物消化管とか乳環境など)によってその有無に違いが生じている(図1)¹³⁾。*spaC*遺伝子において、その途中に終始コドンが入ってORFが2つに分断されている菌株があったが、発現試験を行うと、

図1. 菌体表層タンパク質遺伝子群についての *L. rhamnosus* ATCC 53103と*L. paracasei* ATCC 334の比較ゲノム解析

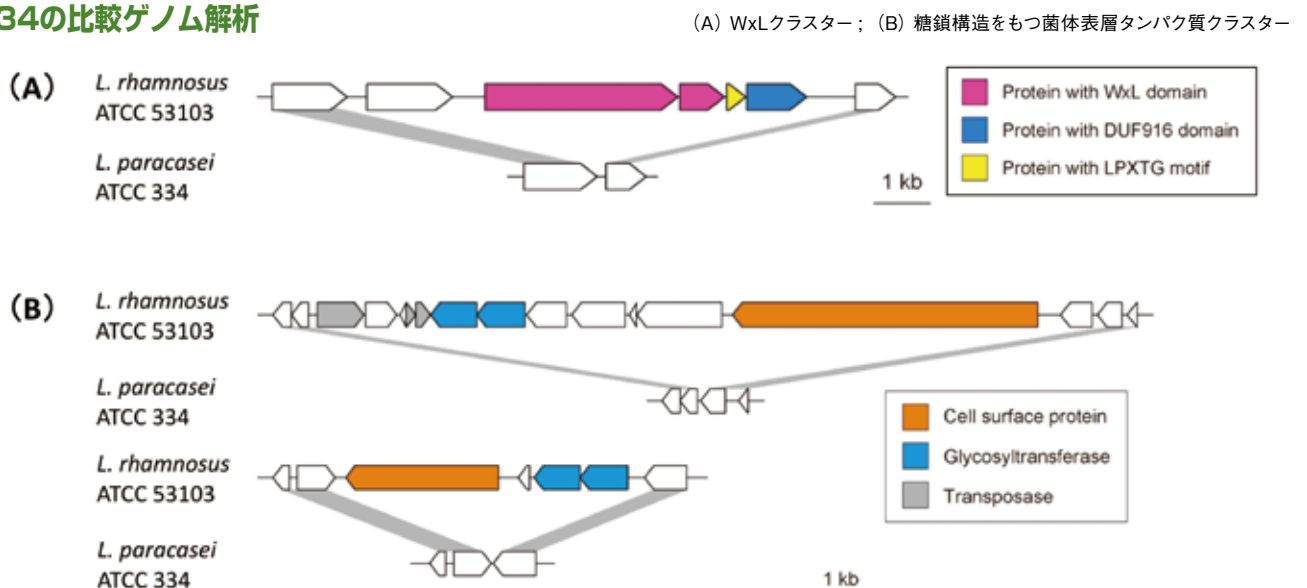
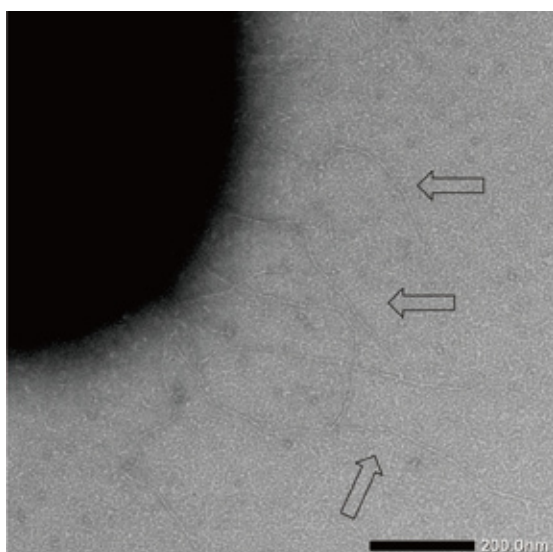


図2 negative染色による*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103の線毛(投稿中)



*spaC*が分断された2つのORFが複数の菌株で発現しており、それには意味があるのかどうか分からないが興味深い。*L. rhamnosus* GG株ではSpaCBA抗体を基盤とした特殊な方法で線毛を検出し^{7, 9)}、素晴らしい仕事であるが、我々は*L. rhamnosus* ATCC 53103株においてnegative染色でも線毛を確認した(図2)。

(2) ビフィズス菌からの線毛の発見

最初のビフィズス菌ゲノムの論文の中で*Bifidobacterium longum*³⁾は線毛を有することが示唆されていたが、線毛の形態学的な証明はなされていなかった。その後、Venturaらのグループ¹⁴⁾は、*B. longum subsp. longum*、*B. longum subsp. infantis*、*B. dentium*、*B. animalis*、*B. adolescentis*、*B. bifidum*から線毛構造の画像を撮影している。このことから、ビフィズス菌の線毛は“bifidobacteria”の中で保存されており、広く種に分布していることが伺える。

また、*B. bifidum*の線毛の機能解析が行われ、付着効果と免疫賦活効果が明らかにされた¹⁵⁾。線毛のこれらの機能に目新しい印象はないが、今までビフィズス菌のプロバイオティクス効果として認識されていたメカニズムの一部がきちんと証明されたことは興味深い。

(3) 乳酸菌の鞭毛について

*Lactobacillus*属のいくつかの菌種に鞭毛がみつかっており、従来より形態学的には知られていたようであるが、O'Tooleらのグループ¹⁶⁾により*Lactobacillus ruminis*のゲノム情報から鞭毛合成のためのすべての遺伝子が確認された。鞭毛の存在は運動性との関連が示唆されるので“乳酸菌と運動性”の話題にも展開される。

*Lactobacillus*属(乳酸菌)に線毛と鞭毛が確認されたことで“乳酸菌には線毛や鞭毛がない”とはいえなくなったが、線毛遺伝子群*spaCBA*と同様に、鞭毛遺伝子群も乳酸菌の範疇の限られた菌種が鞭毛をもっているようである。

(4) 乳酸菌の芽胞について

細菌学において、全ゲノム解析は以前から“パワフル・ツール”とコメントされることが多々あった。線毛や鞭毛では形態学的にはartifactに見える可能性があっても、ゲノム情報からその有無が確認されると安心であり、重要な情報提供になる。

我々はセグメント細菌(Segmented Filamentous Bacteria: SFB)の全ゲノム解析を行って、SFBには芽胞形成能があることを推定した。その論文の中で、詳細なSEMとTEMの電子顕微鏡観察からSFBは芽胞を形成していると結論づけた¹⁷⁾。これは16Sリボソーム遺伝子配列による系統樹から芽胞を形成する*Clostridium*属のクラスター内に位置することからも、その妥当性を窺い知ることができる。過去、SFBの形態学的な論文がありその鮮明な電顕画像を見ると芽胞が写っているが、その論文の中では芽胞形成に関するコメントはなされていなかった。つまり、それまでの情報では、SFBが芽胞を形成している可能性を論ずることができなかったのだと思われる。

では、乳酸菌は芽胞形成に関して、ゲノム情報からはどういう状況なのであろうか？ 成書による乳酸菌の定義では、“芽胞(内孢子)を形成しないこと”とあり、現に芽胞を形成する乳酸菌は例

外なくみつかっていない。乳酸菌のすべての属は *Bacilli* 綱に分類されており、同じ *Bacilli* 綱に分類される *Bacillus* 属の重要な定義は芽胞の形成である。Makarovaら¹⁸⁾は広く乳酸菌 (*Lactobacillales* 目)のゲノム解析を行い、“先祖乳酸菌は芽胞系性能をもっていたことが、数多くの芽胞形成遺伝子群の欠失や疑似遺伝子化から推定できる”とコメントしている。生活環境に恵まれた乳酸菌は芽胞形成する必要がなくなり、不要になった遺伝子を捨てることで進化したものと推察される。

3. *Lactococcus garvieae* における菌株レベルでのブリ属魚類への病原性の有無

Lactococcus 属はチーズスターターの *Lactococcus lactis* に代表されるように安全性の高い細菌という印象があったが、図3と表1のとおり、*L. lactis* の近縁種に魚病細菌でありウシ乳房炎やヒトに対する臨床株として注意すべき病原性をもつ同属の *L. garvieae* がいる。一方で、本菌種は、健全な哺乳動物の消化管からも分離され、生食する野菜や食肉製品からの分離、そして、ヨーロッパでは伝統的なチーズ製造のスターターとして利用されている。すなわち、同菌種のなかで、病原性の有無が菌株レベルで異なっているのである。

高知県沖で1974年に魚病細菌として分離された *L. garvieae* は ATCC に寄託され、継代培養中にその ATCC 49156 はブリ属魚類への病原性を失った。一方、同じ高知県沖で2002年に *L. garvieae* はブリ属魚類に対して強い病原性を示した。そこで、両菌株の全ゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析を行った¹⁹⁾。その結果、図4のゲノムマップとゲノムの特徴の様子から、分離場所も考慮し両菌株の先祖は同じだと推察される。そして、ブリ属魚類への病原性を示すかどうかの違いは莢膜遺伝子群の有無に絞られ、実際に *L. garvieae* Lg2 の莢膜を構成する遺伝子の変異は、その毒性を著しく減少させた¹⁹⁾。

また、生食する可能性のあるブロッコリとカイワレから生菌分離された *L. garvieae* はブリ属魚類に対する病原性はなく、莢膜遺伝子群がな

図3 *Lactococcus* 属とその近縁細菌における全ゲノム公開菌種の ribosomal protein のアミノ酸配列から作成した系統樹

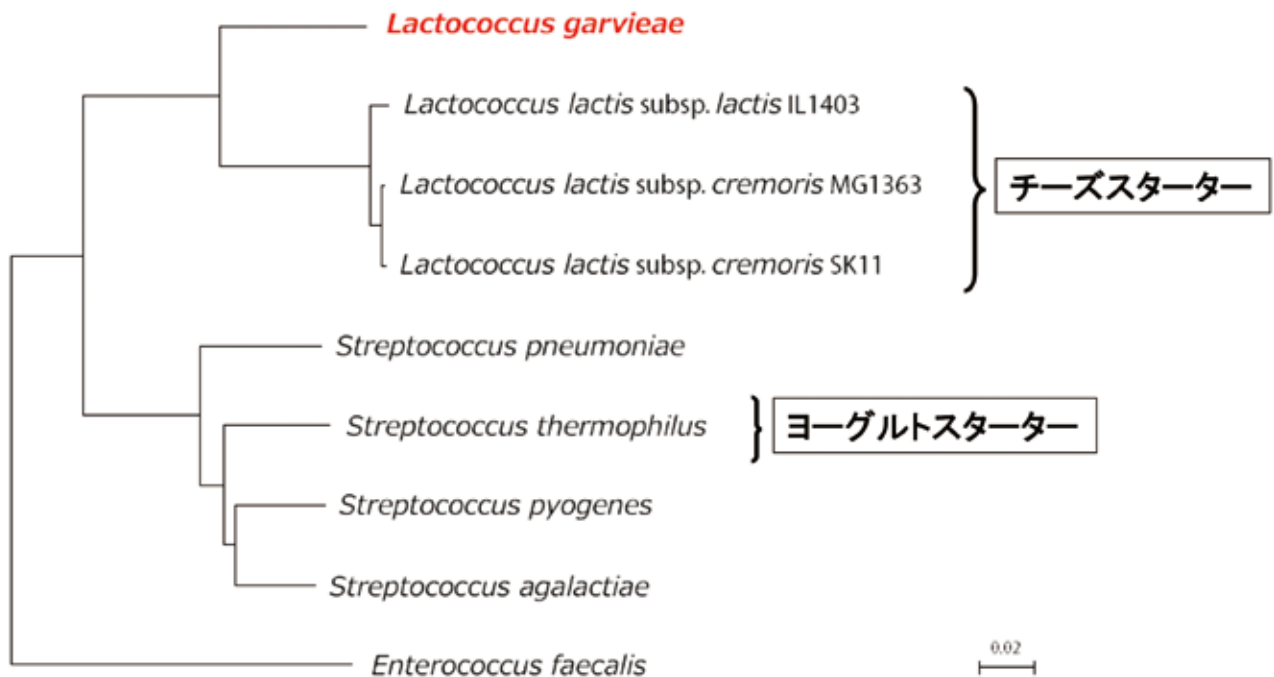
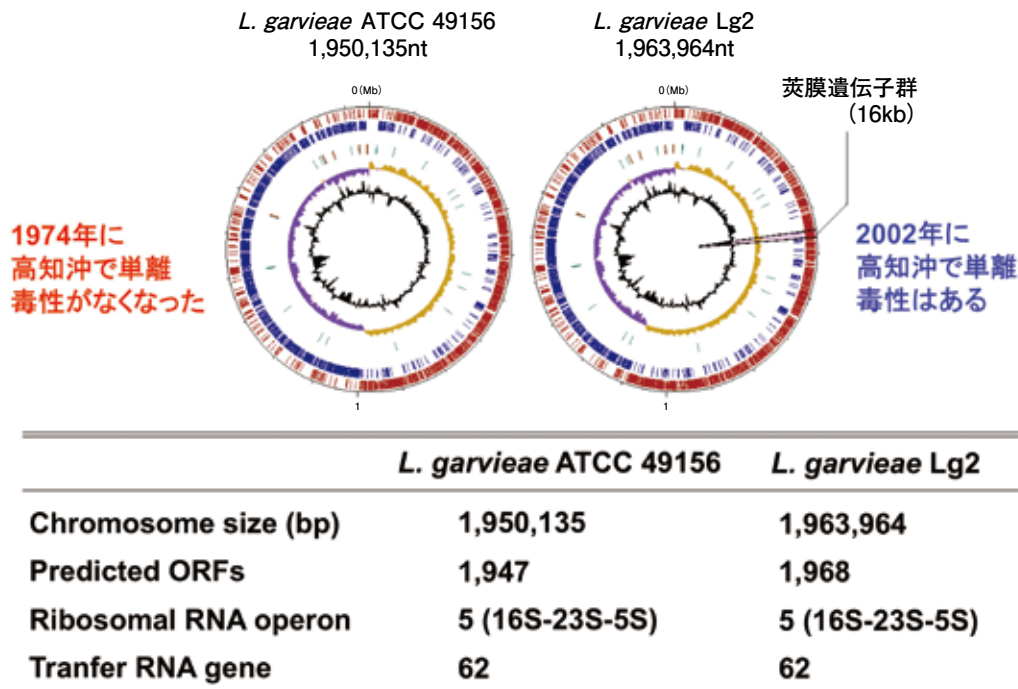


表1 *Lactococcus garvieae*が生菌分離された報告例

分離源	分離部位	疾病(健常)	分離年もしくは報告年
ブリ属	脳、腎臓、肝臓	レンサ球菌症	1974
マス	脳、腎臓、肝臓	レンサ球菌症	1993
ボラ	脾臓	レンサ球菌症	2002
ヒト	血液、骨髄、心内膜	心内膜炎、骨髄炎	1993、1998、2000
ヒト	消化管	日和見感染	2011
ウシ	乳汁	乳房炎	1981、1997、1997、2001
ウシ、イヌ	扁桃	健常	1996
ネコ、ウマ	顔面	健常	1996
カメ	結膜	健常	1996
ブロッコリの芽	ブリ属・マウスに病原性なし		2007
カイワレダイコン	ブリ属・マウスに病原性なし		2007
チーズ(イタリア製)	良い製品製造のためのスターター		2007
健常人の糞便	エクオール産生菌		2007
食肉(ソーセージ)	ビルレンス遺伝子(?)		2013

図4 *L. garvieae* ATCC 49156とLg2のゲノムマップとゲノムの特徴



いことを確認した²⁰⁾。そして、種々の異なる分離源からの *L. garvieae* のdraft配列が公開されてきたことで比較ゲノム解析が可能となった。それから導かれた情報の1つとして、ヒト臨床株として分離された菌株に莢膜遺伝子群はなかったが、ヒ

ト由来株にはその他の分離源の *L. garvieae* にはない遺伝子を多数もっており²⁰⁾、それが本菌種の病原性を示す対象(生物種)に特異性がある理由とも推察された。

4. おわりに

高速シーケンサーの進化によって、細菌ゲノムのdraft配列やcomplete配列を得る作業は増えているが、論文化が追い付いていない現状を実感する。論文化できないと配列の公開を躊躇するのは研究者の普通の思いであろう。“American Society for Microbiology (ASM)”が発行する3雑誌(Eukaryotic Cell、Journal of Bacteriology、Journal of Virology)の中に“Genome announcement”という1コーナーがあったが、現在はその役目を“Genome Announcements”というオンラインJournalが引き受ける形になった。これは、論文化に時間がかかって眠ってしまっているゲノム配列公開のきっかけになるという実感をもっている。我々は、2011年に健常なサラブレッドの消化管から分離した*Lactobacillus equicursoris*を新

菌種として提唱し²¹⁾、新菌種提唱のルールに基づき公的バイオリソースセンターに寄託した。今年2013年に、パスツール研究所のメンバーは、その*L. equicursoris*ゲノムのdraft配列を決定し、彼らの分離した菌株のdraft配列と比較することで、両菌株が同種であることを結論づけている²²⁾。もちろん、draft配列決定により他にも多くの情報が得られるが、菌種の同定にゲノム配列を決定してしまう時代に突入しているようである。

謝辞：ここに記述した知見の多くは、東京大学大学院新領域創成科学研究科情報生命科学専攻 服部正平 教授および大島健志朗 特任助教、九州大学生体防御医学研究所ゲノム機能制御学部門 藤英博 特任講師との共同研究によるものであり、ここに謝意を表す。

文 献：

- 1) Bolotin A, et al: Genome Res, 11: 731-753 (2001).
- 2) Kleerebezem M, et al: Proc Natl Acad Sci USA, 100: 1990-1995 (2003).
- 3) Schell MA, et al: Proc Natl Acad Sci USA, 99: 14422-14427 (2002).
- 4) Fukuda S, et al: Nature, 469: 543-547 (2011).
- 5) Parkhill J, et al: Nat Rev Microbiol, 2013, doi: 10.1038/nrmicro3112.
- 6) Douillard FP, et al: PLoS Genet, 9: e1003683 (2013).
- 7) Kankainen M, et al: Proc Natl Acad Sci USA, 106: 17193-17198 (2009).
- 8) Morita H, et al: J Bacteriol, 191: 7630-7631 (2009).
- 9) Lebeer S, et al: Appl Environ Microbiol, 78: 185-193 (2012).
- 10) Tripathi P, et al: ACS Nano, 7: 3685-3697 (2013).
- 11) Mazmanian SK, et al: Science, 285: 760-763 (1999).
- 12) Ton-That H, et al: J Biol Chem, 275: 9876-9881 (2000).
- 13) Toh H, et al: PLoS ONE, in press.
- 14) Foroni E, et al: Microb Cell Fact, 10: S16 (2011).
- 15) Turroni F, et al: Proc Natl Acad Sci USA, 110: 11151-11156 (2013).
- 16) Forde BM, et al: Microb Cell Fact, 10: S13 (2011).
- 17) Prakash T, et al: Cell Host Microbe, 10: 273-284 (2011).
- 18) Makarova K, et al: Proc Natl Acad Sci USA, 103: 15611-15616 (2006).
- 19) Morita H, et al: PLoS One, 6: e23184 (2011).
- 20) Miyauchi E, et al: Int J Microbiol, 2012: 728276 (2012).
- 21) Morita H, et al: Int J Syst Evol Microbiol, 60: 109-112 (2010).
- 22) Cousin S, et al: Genome Announc, 1: e00663-13 (2013).