

東京農業大学
博士論文

ミツバチ共生フルクトフィリック乳酸菌の環境適応と
代謝産物の養蜂利用への可能性

指導教員 遠藤 明仁 准教授

令和 2 年 3 月 17 日

東京農業大学大学院

生物産業学研究科 生物産業学専攻

前野 慎太郎

目次

序章 緒言	4
第 1 章 <i>Lactobacillus kunkeei</i> と近縁菌の比較ゲノム解析から明らかにする FLAB のゲノムの特徴.....	12
第 1 節 57 菌種の <i>Lactobacillus</i> 属と 16 株の <i>Lactobacillus kunkeei</i> の比較ゲノム.....	14
第 2 節 ゲノムの小さい <i>Lactobacillus</i> 属と <i>L. kunkeei</i> のゲノム比較.....	33
第 3 節 <i>Lactobacillus kunkeei</i> の <i>adhE</i> の特徴.....	55
第 4 節 要約.....	66
第 2 章 <i>Fructobacillus fructosus</i> NRIC 1058^T 株の生育特性における <i>adhE</i> 遺伝子の影響	68
第 1 節 大腸菌内での <i>adhE</i> のクローニングと <i>Fructobacillus fructosus</i> へ <i>adhE</i> の導入.....	70
第 2 節 <i>adhE</i> が <i>Fructobacillus fructosus</i> NRIC 1058 ^T 株の生育特性に及ぼす影響.....	91
第 3 節 要約.....	100
第 3 章 <i>Leuconostoc citreum</i> F192-5 株が行ってきた菌株特異的な進化.....	101
第 1 節 <i>Leuconostoc citreum</i> F192-5 株の表現性状解析.....	103
第 2 節 F192-5 株とほかの <i>Leuc. citreum</i> 菌株との比較ゲノム解析.....	109
第 3 節 F192-5 株の <i>adhE</i> 遺伝子に着目した解析.....	120
第 4 節 要約.....	131
第 4 章 <i>Lactobacillus kunkeei</i> FF30-6 株が生産するバクテリオシン <i>kunkecin A</i> の構造と特徴解析	133
第 1 節 <i>Lactobacillus kunkeei</i> FF30-6 株のゲノムデータからバクテリオシン関連遺伝子の探索.....	135
第 2 節 <i>kunkecin A</i> の抗菌スペクトルの作成.....	143

第 3 節 要約	152
総括	153
参考文献	159
英語要旨	エラー! ブックマークが定義されていません。
謝辞	171

序章 緒言

乳酸菌はグラム陽性、カタラーゼ陰性の桿菌または球菌で内性胞子を形成せず、消費したグルコースに対して 50% 以上の乳酸を生産するという特徴を有する細菌群で、現在の分類学的見地によれば 16S ribosomal RNA 遺伝子に基づく系統解析によって、*Lactobacillales* 目に分類される細菌を総称して呼ぶ (1)。乳酸菌は我々が口にする発酵食品や乳製品をはじめ、植物質環境や、動物の腸管内など自然界に幅広く生息していることが知られている (2, 3)。また、乳酸菌は漬物や発酵乳といった発酵食品をはじめとする人の生活の近くにも生息していることから (4-7)、昔から乳酸菌は人の生活に欠かせない微生物であったと考えられる。乳酸菌はこのように様々な環境から見出されているが、これまでの乳酸菌研究により、乳酸菌はゲノムレベルで進化を行うことによって、様々な環境に適応することが可能になったことが明らかにされている (8, 9)。例えば、動物腸管内に生息している乳酸菌は胃液や胆汁酸といった消化液に対して耐性を有し (10, 11)、発酵乳中に生息する乳酸菌はプロテアーゼにより乳中のたんぱく質を分解し、分解物をアミノ酸として代謝する (12)。また、植物環境中に生息する乳酸菌は環境ストレスに強いという特徴を有しており、このように生息するそれぞれの環境に合わせた特徴を有していることが知られている (13, 14)。

フルクトフィリック乳酸菌 (FLAB) はフルクトースを好む乳酸菌群の総称であり、花や果物、ミツバチなどの昆虫の腸管内といったフルクトース豊富な環境から見出される乳酸菌である (15-17)。一般的な乳酸菌はほかの生物と同様にグルコースを主なエネルギー源としており、グルコースを生育基質とする培地を用いて培養を行うと良好な生育を見せるという特徴を有している。その一方で、FLAB はグルコースを生育基質とした培地を用いて培養を行うとほとんど生育をせず、フルクトースを生育基質とする培地では良好な生育を見せる (Fig. 1a) (15,

18)。さらに、ピルビン酸や酸素といった電子受容体存在下ではグルコースを生育基質とした培地においても良好な生育を見せる (Fig. 1a)(15)。乳酸菌は通性嫌気性細菌として分類されており、一般的に乳酸菌は嫌気環境を好み、呼吸鎖は有していない。一方で、FLAB は酸素により生育が劇的に改善され (Fig. 1b)、このような生育特性は乳酸菌研究の世界において、これまでの概念から外れている。現在、FLAB として *Fructobacillus* 属に分類される 5 菌種 (*Fructobacillus fructosus*、*Fructobacillus durionis*、*Fructobacillus ficulneus*、*Fructobacillus pseudoficulneus*、*Fructobacillus tropaeoli*) と (18, 19)、*Lactobacillus kunkeei* の 6 菌種がこれまでに報告されている (20) (Fig. 2)。FLAB の代表菌種である *F. fructosus* はもともと 1955 年に花から *Lactobacillus fructosus* として分離され、グルコース、ペプトン、酵母エキスを合わせた培地にトマトジュースを添加することで生育する非常にユニークな特徴のある乳酸菌として分離された。2002 年に系統的近縁菌としてイチジクから *Leuconostoc ficulneus* が分類され、*L. fructosus* は *Leuconostoc fructosum* として *Leuconostoc* 属に再分類された (3)。これらの近縁菌は最近になり分離報告が増え、2005 年には *Leuconostoc durionis* がマレーシアのドリアンの発酵食品である tempoyak から (21)、2006 年には *Leuconostoc pseudoficulneum* がイチジクから分離された (22)。いずれもフルクトース豊富な環境から分離されたこれらの菌種は、2008 年に Endo らによって系統学的な特徴と、ユニークな生化学的特徴から、*Fructobacillus* 属に再分類され (18)、生育特性についても明らかにされた。また 1998 年にワインから分離された *L. kunkeei* は (23)、FLAB が提唱されてからの研究で花や果物、新鮮なハチミツ中から分離され (17, 24)、フルクトフィリックな特徴を有することが明らかにされた (20)。*Lactobacillus* 属は現在 300 菌種以上報告されているが (25)、フルクトフィリックな特徴を示す菌種は *L. kunkeei* のみである。現在では FLAB の生育特性はよく知られることとなったが、フルクトフィリックな特性が見出される以前は一般

的な生育基質であるグルコースをほとんど代謝しないことから、FLAB は乳酸菌の一般的な培地では培養できない難培養性乳酸菌に相当していたことが考えられる。

一般的なヘテロ発酵乳酸菌はグルコースを代謝してほぼ等モルの乳酸と二酸化炭素、エタノールを生産することが知られている。このエタノール生産にはアルコール脱水素酵素活性とアセトアルデヒド脱水素酵素活性を有している二機能性タンパク質 AdhE をコードする遺伝子 *adhE* が非常に密接に関係している。しかし、FLAB の代表菌群である *Fructobacillus* 属はこれまでの我々の研究により、この *adhE* 遺伝子を欠損しており、そのためグルコース代謝によって、酢酸が主に生産されることが明らかにされている (26)。一般的なヘテロ発酵乳酸菌はグルコースを代謝する過程の代謝上流で生じた 2 mol の NAD(P)H を、アセチルリン酸からエタノールに代謝する過程で NAD(P) に酸化することで、全体の酸化還元バランスを維持している (Fig. 3a)。しかし *Fructobacillus* 属細菌は *adhE* を欠損していることから、代謝上流で生じた 2 mol の NAD(P)H を酸化できず、NAD/NADH バランスに不均衡が生じるため、グルコースを代謝することができないと考えられている (Fig. 3b)。我々は近年、*Fructobacillus* 属細菌とその近縁菌である *Leuconostoc* 属細菌の比較ゲノム解析を行った。その結果、*Fructobacillus* 属は *Leuconostoc* 属細菌と比較して糖代謝関連遺伝子をはじめとする代謝系遺伝子の特異的に欠落させ、ゲノムを小さくしていることが明らかとなった (27)。*Fructobacillus* 属細菌はフルクトース豊富な環境に適応する過程で *adhE* をはじめとする多くの遺伝子を欠損させ、ゲノムレベルで進化をしていることが明らかにされている (26, 27)。このように *Fructobacillus* 属細菌のゲノムの特徴は明らかにされているものの、同じく FLAB である *L. kunkeei* のゲノムの特徴はこれまでに明らかにされていない。

近年、乳酸菌をはじめとする細菌をプロバイオティクスとして利用することで、

病気の予防や健康増進をはかろうとする取り組みは、ヒトだけでなく、ウシやブタ、トリなどの家畜動物においても一定以上の効果を上げており、さらに多くの動物の健康増進のための利用が期待されている (28)。ヒトの健康増進や生活の質 (QOL; Quality of life) の向上のために乳酸菌研究は盛んに行われており、FLAB に対しても同様に行われている。FLAB はカカオやドリアンなどの発酵食品中 (14, 29-31)、蜂蜜や花粉団子 (花粉荷) といったミツバチ環境に生息していることから自然由来の食品素材としても着目されている。熱殺菌した *L. kunkeei* の摂取は健康な成人において免疫グロブリン A (IgA; Immunoglobulin A) の生産を促進させることが明らかにされ (32)、口腔内においてはインフルエンザに対する特異的 IgA 生産を促進させることが報告されている (33)。ヒトのみならず、FLAB はミツバチの消化管内細菌の最優勢菌の一つとして知られ (34, 35)、その親和性の高さから、ミツバチプロバイオティクスとしての応用面も期待され、世界中で盛んに研究が行われている (36-38)。ミツバチは世界の約 70% の作物の受粉を行う花粉媒介昆虫であり (39)、その受粉による経済効果は 1,530 億€ にも及ぶと試算されている (40)。ミツバチの減少による作物の不作は、我々の食糧生産にも密接にかかわっている為、その減少を食い止めることは世界的な課題である。病気や薬剤耐性などの機能を微生物や昆虫によって宿主に伝播させるパラトランスジェニックという考えが 1997 年に提唱され (41)、*L. kunkeei* はミツバチに対するパラトランスジェニックな能力を有している可能性が示唆されている (36)。FLAB はミツバチ消化管内に生息しているが、これまで FLAB と宿主やミツバチの消化管内細菌の共生関係に迫る報告はほとんどされておらず、FLAB がミツバチ消化管内細菌に与える影響がほとんど分かっていない。本研究ではその一部を明らかにし、FLAB の養蜂業において利用が可能か、その検討を行った。

本研究ではまず、第 1 章として FLAB のゲノムレベルの進化の様式を明らかにするために、*L. kunkeei* とそのほかの *Lactobacillus* 属細菌の比較ゲノム解析を

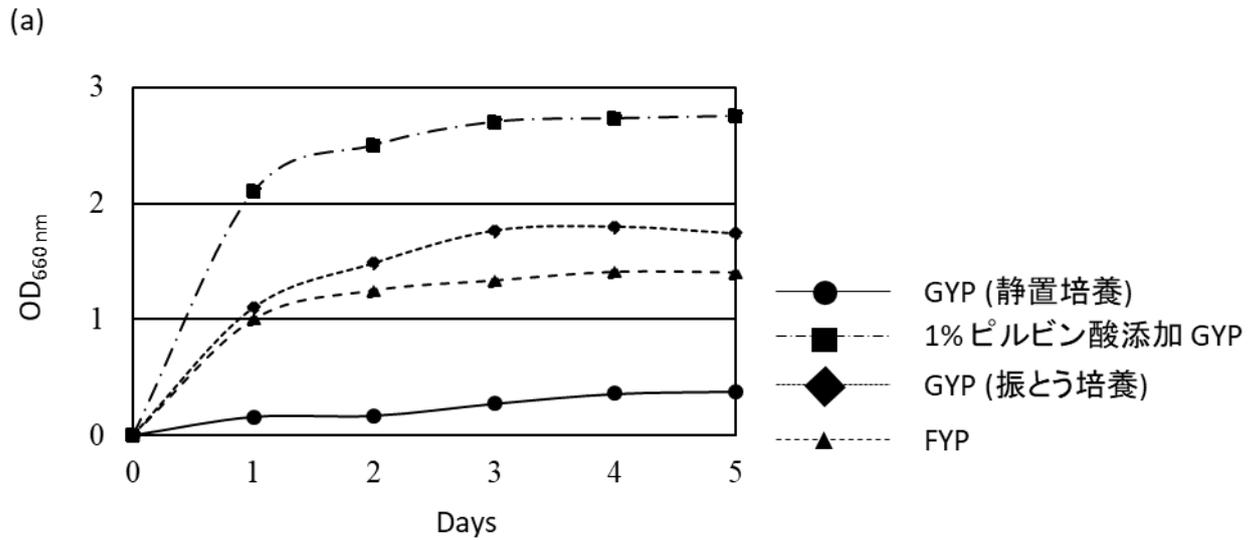
行った。近縁菌との比較から FLAB がもつゲノムの特徴を明らかにし、乳酸菌がどのようにして、特異な生育特性を獲得し、フルクトース豊富な環境への適応してきたのか、ゲノムレベルの進化の様式に迫った。

第 2 章では、FLAB のもつ稀有な生育特性は *adhE* 遺伝子の欠損によるものであると考えられているが、実験レベルでの証明はこれまでにされてこなかった。そこで *adhE* の欠損は本当にフルクトフィリックな特徴を決定づける重要なカギであるのか明らかにするために、FLAB の代表菌種である *F. fructosus* を近縁種由来の *adhE* で形質転換し、生育特性を解析することで、稀有な生育特性の原因を解明した。

第 3 章では我々が南アフリカでみかんの皮より分離した *Leuconostoc citreum* F192-5 株の生育特性とゲノムの特徴に迫った。この F192-5 株は一般的なヘテロ発酵乳酸菌に分類される *Leuc. citreum* に分類されるにもかかわらず、グルコースをほとんど代謝できないというフルクトフィリック様の特徴を有している。この F192-5 株が有する菌株特異的なフルクトフィリック様の特徴に着目し、比較ゲノム解析及び生化学的解析から菌株特異的なフルクトース豊富な環境への適応に迫った。

第 4 章では、*L. kunkeei* FF30-6 株が生産するミツバチ腐蛆病の病原菌 *Melissococcus plutonius* に対して特異的な抗菌活性を示す *kunkecin A* の生産様式、その構造及び生成物の抗菌スペクトルにゲノム解析と生化学的解析により迫った。

以上のことから、FLAB が行ってきた環境適応を明らかにし、FLAB の代謝産物の利用の可能性に迫った。



(b)

<i>Leuconostoc</i>	<i>Fructobacillus</i>	<i>Leuc.</i>	<i>F.</i>
<i>mesenteroides</i>	<i>fructosus</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>fructosus</i>
NRIC 1541 ^T	NRIC 1058 ^T	NRIC 1541 ^T	NRIC 1058 ^T



Fig. 1. FLAB の代表菌種 *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058^T の生育の特徴

a; グルコース及びフルクトースを糖源とした培地、また電子受容体存在下における FLAB (*Fructobacillus fructosus* NRIC 1058^T) の生育曲線を示した。、b; FLAB (*F. fructosus* NRIC 1058^T; 右半分) と近縁な乳酸菌 (*Leuc. mesenteroides* NRIC 1541^T; 左半分) のグルコースを糖源とする培地上で培養 (30 °C, 48 h) した時のコロニーの形態観察写真を示した。

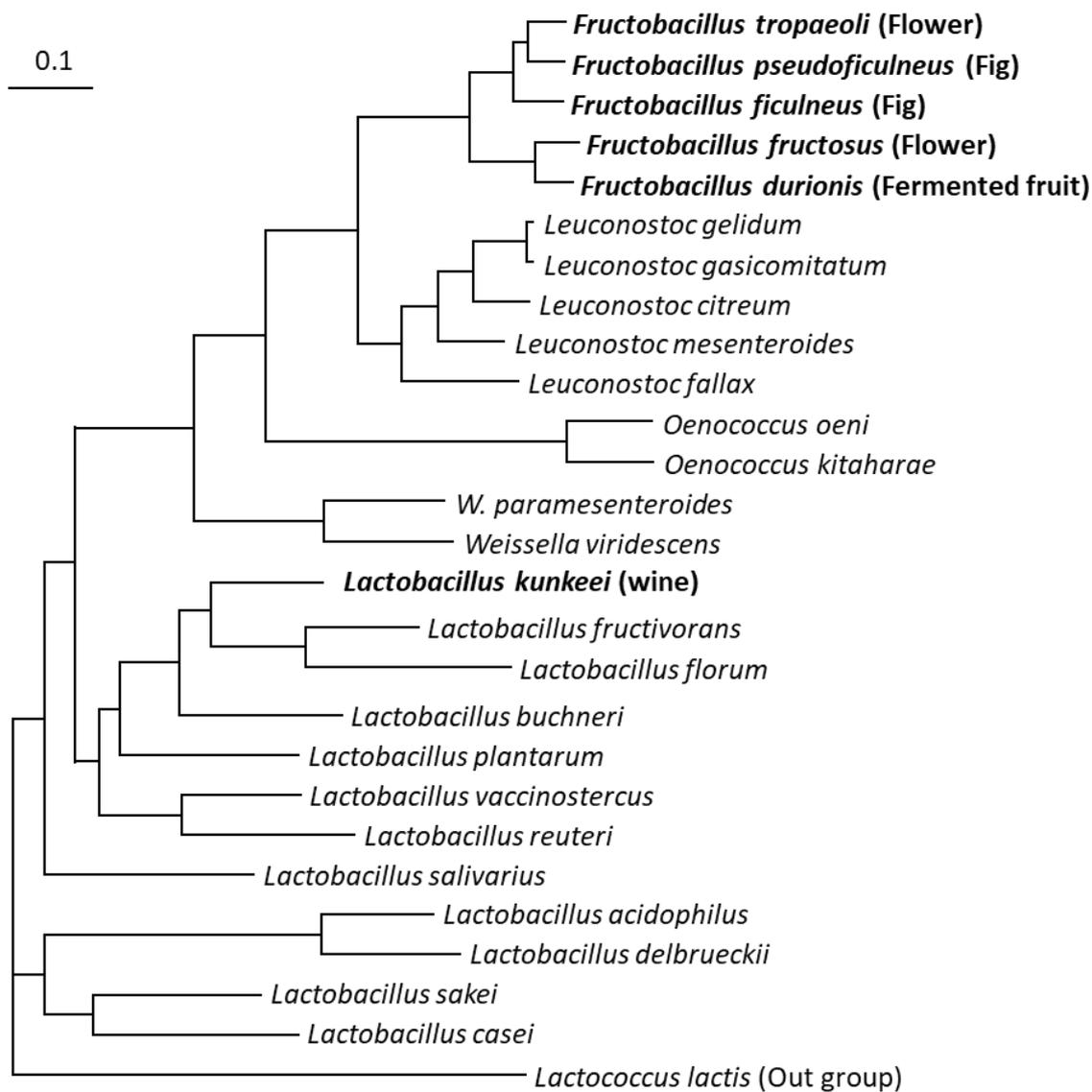
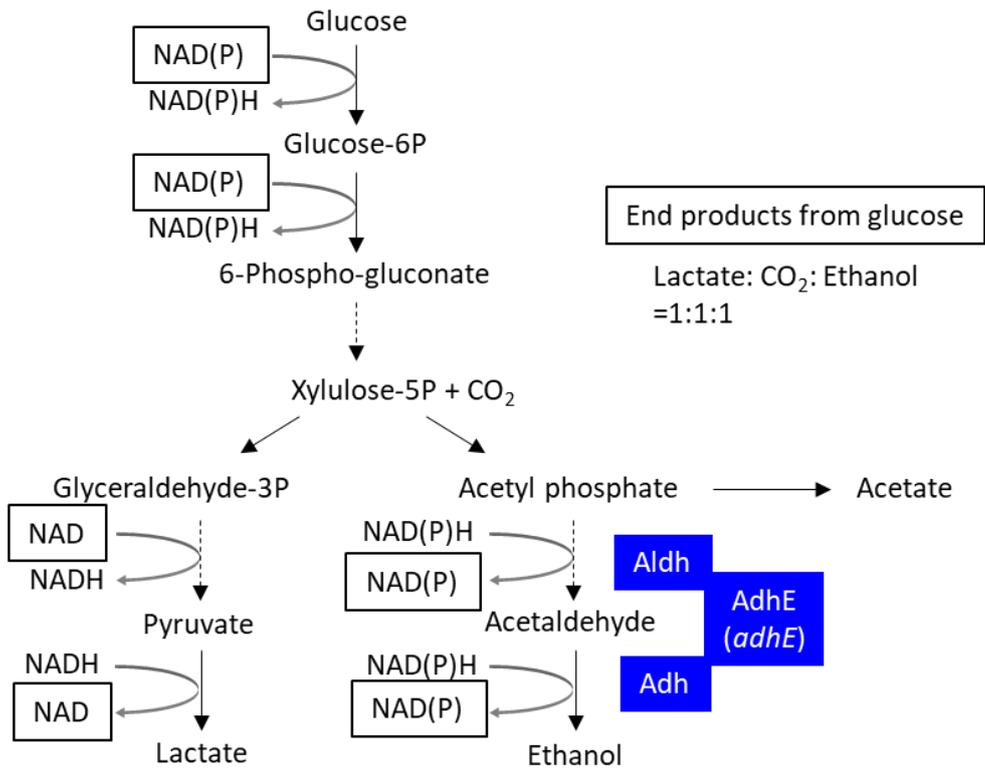


Fig. 2. FLAB の系統的關係を表した 78 個のコアゲノムに基づく系統樹

FLAB は太字で示している。括弧内に示しているのは分離源である。
Lactococcus lactis は外群として使用した。

(a)

一般的なヘテロ発酵乳酸菌



(b)

フルクトフィリック乳酸菌 (*Fructobacillus* 属細菌)

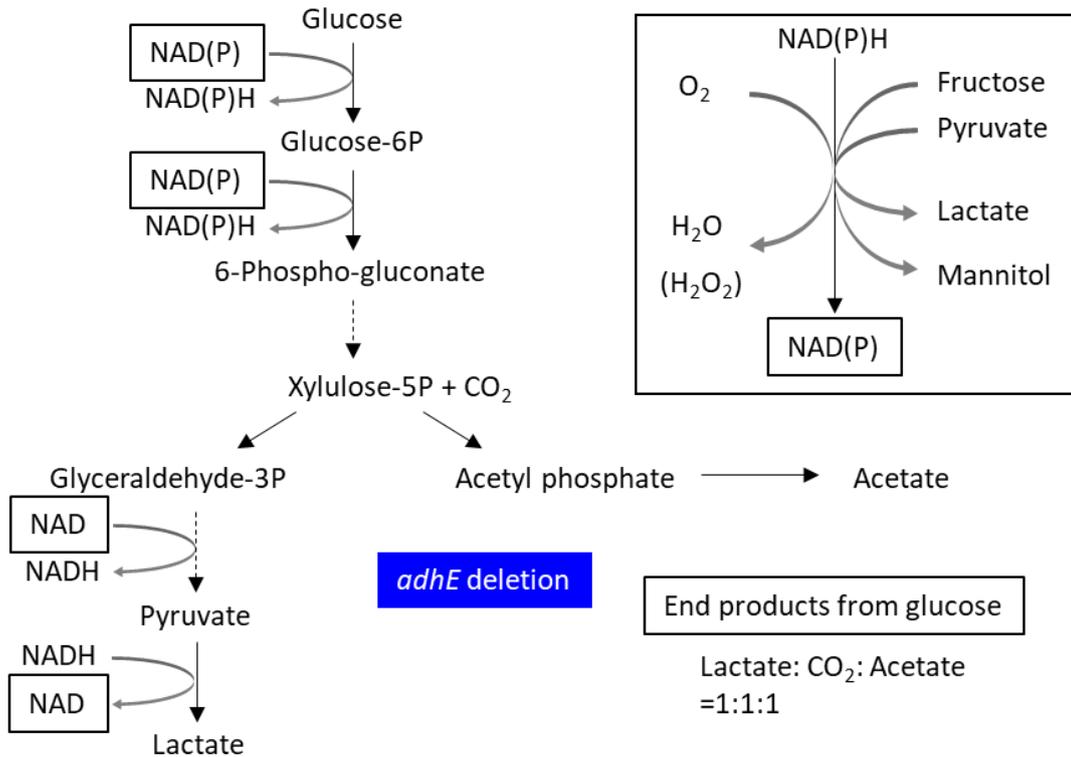


Fig. 3. 一般的なヘテロ発酵乳酸菌と *Fructobacillus* 属のグルコース代謝

a; 一般的なヘテロ発酵乳酸菌のグルコース代謝, b; *Fructobacillus* 属細菌のグルコース代謝の代謝経路を示した。

第 1 章 *Lactobacillus kunkeei* と近縁菌の比較ゲノム解析から明らかにする FLAB のゲノムの特徴

序

Lactobacillus kunkeei は 300 菌種以上も分類される非常に多様な *Lactobacillus* 属の中で唯一のフルクトフィリックな特徴を有している菌種として報告されている。*L. kunkeei* は 1998 年にワインもろみから分離され (23)、その後 *L. kunkeei* の生態や生化学的特徴については、ほとんど研究がなされていなかった。2009 年には花や果物に生息する FLAB の研究が行われ *L. kunkeei* が多数分離され生態学的特徴が明らかにされた (15)。*L. kunkeei* は花や果物、ミツバチの消化管といった様々なフルクトース豊富な環境から見出されるが、分離源によらずフルクトフィリックな特徴を有していた (20)。また、近年ミツバチ消化管内の最優勢菌の 1 種であることが明らかになり (34)、世界中でその応用面が注目され、盛んに研究されている。

乳酸菌は様々な環境に生息しており、その生息している環境に合わせてゲノムレベルで進化をしているという乳酸菌種について報告がされている。例えば、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus* は互いに発酵乳中で共生しており、*S. thermophilus* は病原性を持つ遺伝子を欠落させていることが明らかにされている (42, 43)。また、発酵パンやサワードウから見出される *Lactobacillus sanfranciscensis* も遺伝子を欠落させ、ゲノムを小さくすることにより生息する環境に適応し、退行的進化をしてきたことが明らかにされている (44)。一方で、低温耐性を有する *Lactobacillus hokkaidonensis* はグルタチオン蓄積を行う遺伝子を獲得することで環境に適応してきたことが明らかにされている (45)。このように乳酸菌は遺伝子を獲得または、欠損させることで生息する環境

に適應してきたことがすでによく知られている。

また、*Fructobacillus* 属は *adhE* 遺伝子を欠損させることによってフルクトフィリックな特徴を獲得したと考えられているが (26)、*L. kunkeei* はなぜフルクトフィリックな特徴を有しているのかは明らかにされていない。さらに、*L. kunkeei* のゲノムの特徴に関する研究は限定的に行われているものの (37)、近縁菌である *Lactobacillus* 属細菌との比較ゲノム解析やフルクトフィリックな特徴と関連させた研究は行われていない。

そこで、本章では我々がミツバチから分離した *L. kunkeei* FF30-6 株のドラフトゲノムを決定し、そのドラフトゲノムとほか 15 株の *L. kunkeei* のゲノムを多様な *Lactobacillus* 属 57 菌種のゲノムと比較することで、*L. kunkeei* が行ってきた進化の様式を明らかにすることを目的とする。また、*L. kunkeei* が持つフルクトフィリックな特徴の原因に迫るために *adhE* 遺伝子に着目した解析も行った。

第 1 節 57 菌種の *Lactobacillus* 属と 16 株の *Lactobacillus kunkeei* の比較ゲノム

Lactobacillus 属は様々な系統群に分けられることから、各系統群から非選択的に数菌種ずつゲノムデータを集め、比較解析を行った。その際に今回使用されるゲノムデータのクオリティーや *L. kunkeei* の系統分類に関する評価を行うため、GGDC や ANI、checkM を用いて *in silico* 解析によるデータの評価も行った。

【実験方法】

1. *Lactobacillus kunkeei* FF30-6 の培養と DNA 抽出

フィンランドの西洋ミツバチ (*Apis mellifera*) 消化管から分離された *L. kunkeei* FF30-6 は FYP 培地にて 30°C で 24 時間培養を行った(15)。1 mL の培養液を 1.5 mL ねじ口チューブに移して遠心分離 (8,000 rpm、5 分、RT) し、菌体を回収した。250 μ L の Extraction buffer (100 mM Tris-HCl; 40mM EDTA)、50 μ L の 10% SDS、300 μ L の benzyl chloride、0.1 g の 0.1 mm 径ガラスビーズをチューブに入れた。その後、小型恒温振とう培養器 (TAITEC BioShaker M•BR-022) で 2,500 rpm、50°C、20 分間の条件で菌体を破碎した。150 μ L の 3M Sodium acetate を加え、1 秒間ボルテックスをした。それを氷中で 15 分静置した後、遠心分離 (15,000 rpm、10 分、RT) し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。450 μ L の 2-propanol を加え 1 秒間ボルテックスした後、遠心分離 (15,000 rpm、15 分) し上清を捨てた。300 μ L の 70% Ethanol を加え、遠心分離 (15,000 rpm、5 分) し、丁寧に上清を捨てた。5 分間減圧乾燥し、50 μ L の TE buffer で溶解した (46)。このプロトコールは以下に簡易的に記した (手順 1)。

手順 1. 細菌 DNA 抽出のプロトコール

1. 1 mL 培養液を 1.5 mL ねじ口チューブに移して遠心分離 (8,000 rpm、5 分、RT)。
2. 培養上清を廃棄。
3. 250 μ L の Extraction buffer (100 mM Tris-HCl; 40mM EDTA)、50 μ L の 10% SDS、300 μ L の benzyl chloride、0.1 g の 0.1 mm 径 ガラスビーズを入れた。
4. 振とう器 (TAITEC BioShaker M・BR-022) で 2,500 rpm、50°C、20 分間菌体破碎。
5. 150 μ L の 3M Sodium acetate を加え、1 秒間ボルテックス。
6. 氷中で 15 分静置。
7. 遠心分離 (15,000 rpm、10 分、RT) し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。
8. 450 μ L の 2-propanol を加え 1 秒間ボルテックス。
9. 遠心分離 (15,000 rpm、15 分) し上清を廃棄。
10. 300 μ L の 70% Ethanol を加え、遠心分離 (15,000 rpm、5 分) し、丁寧に上清を廃棄。
11. 5 分間減圧乾燥。
12. 50 μ L の TE buffer で溶解。
13. DNA サンプルの 230、260、280 nm における吸光度を測定し、抽出した DNA サンプルのクオリティーを確認した。

2. FF30-6 株のドラフトゲノムの決定とアッセンブリ、アノテーション

Lactobacillus kunkeei FF30-6 株のドラフトゲノムは次世代シーケンサー Illumina Miseq を用い、インサートの長さは 500 bp を使用した。7,673,448 リードを読み、その平均は 276 bp であった。アッセンブリはショートリード用の Velvet assembler (Version 1.2.10) を使用し (47)、25 のコンティグをもつ 1,580,411 bp (N50: 165,447 bp) のドラフトゲノムを決定した。この時に 300 bp 以下の短いものは信頼性が低いため、取り除いた。アノテーションは Prokka アノテーション (48) と DDBJ への登録が迅速に行えるオンラインツールの DFAST (<https://dfast.nig.ac.jp>) を用いた (49)。

3. FF30-6 株のドラフトゲノムデータの登録

Lactobacillus kunkeei FF30-6 株のシークエンスデータは DDBJ/EMBL/GenBank International Nucleotide Sequence Database に登録した。アクセッション番号は NZ_BDDX01000000 である (Table 12)。

4. そのほかの *Lactobacillus* 属細菌と *Fructobacillus* 属細菌のゲノムデータ

本研究で用いた *Lactobacillus* 属細菌のドラフトゲノムのデータおよび、コンプリートゲノムのデータは DAGA (DFAST Archive of Genome Annotation, <https://dfast.nig.ac.jp>) を用いて取得した (49)。本データベースのゲノムデータは全て DFAST (DDBJ Fast Annotation and Submission Tool) により、再アノテーションされている為、アノテーションのやり直しは行っていない。*Lactobacillus* 属細菌は様々な系統群に分けられることが知られていることから、各系統群から非意図的に菌種を抽出し、データの取得を行った。同じ種として複数株のゲノムデータが登録されているものは、(1) 過去に研究が盛んに行われている菌株 (*Lactobacillus rhamnosus* GG、*Lactobacillus plantarum* WCFS1 など)、(2) コンプリートゲノム、(3) 基準株、(4) 上記以外の NCBI に登録されているゲノムデータの優先順位でゲノムデータを収集し、解析に用いた。それぞれのゲノムデータのアクセッション番号は Table 1 に示した。ゲノムデータのクオリティを評価するため、checkM (Version 1.0.4) にて評価を行った (50)。checkM は基準となるマーカーをゲノム中に設定し、検定を行う。Completeness は、ゲノムデータ中のマーカー遺伝子の決められた一部の配列を保持しているとその値が高く評価され、設定されたマーカー遺伝子の決められた一部の配列がゲノムデータ中に含まれていないと値は低く評価されるため、ゲノムデータの質が悪いと数値が低くなる。マーカー遺伝子は基本的に 1 コピーしか保存されていない遺伝子を用いている。

Contamination ではそのマーカー遺伝子を何コピー数保持しているかをカウントすることで、ゲノムのコンタミネーションの割合を算出する。マーカー遺伝子が複数検出されると高くなり、別の菌種 (株) のゲノムがコンタミネーションしている可能性を示唆する。今回のマーカーの設定は *Lactobacillus* 属菌種には “genus *Lactobacillus*” を用い、*Fructobacillus* 属菌種には “genus *Leuconostoc*” を用いた。“genus *Lactobacillus*” には 135 株分のゲノムデータを基に 409 個のマーカー遺伝子が設定されており、“genus *Leuconostoc*” には 15 株分のゲノムデータを基に 611 個のマーカー遺伝子が設定されていた。ここでは 2016 年 5 月時点の解析結果を示した。

5. ゲノムデータの解析と統計処理

それぞれの菌種のゲノムサイズや遺伝子数といった基本的なデータは R を用いて箱ひげボックスを描画 (boxplot) し、解析した。2 群間の有意差検定は Mann-Whitney U テストを行い、3 群以上の有意差検定には Kruskal-Wallis テストを行ったのちに、post-hoc テストを行った。 p 値が 0.05 以下の時に有意差があると判断した。これらの有意差検定は Windows 用 IBM SPSS (Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) を用いた。

Pyani script (<https://github.com/widdowquinn/pyani>) により Average Nucleotide Intity (ANI) を求めた (51)。ANI は 1 株のゲノムを断片化し、もう一方のゲノムと BLASTN のアルゴリズムを用いて、相同性を検索し、2 株のゲノムの相同性を数値化するプログラムである。また、Genome to Genome Distance Calculator (Version 2.1) (GGDC, <http://ggdc.dsmz.de>) を用いて ANI との結果の比較を行った。GGDC はゲノムデータを用いて in silico DNA-DNA hybridization を行うオンラインサービスであり (52)、formula 2 の値が ANI と相関があるとされている。

L. kunkeei の遺伝子の保存性を評価するために、GET_HOMOLOGUES software

(version1.3) を用いて、すべてのタンパク質のオーソログを調べた (53)。GET_HOMOLOGUES はそれぞれの遺伝子すべてに対して BLAST 検索を行い、オルソログな遺伝子を決定し、クラスタリングを行うソフトウェアである。その後、自作スクリプトにてコアゲノム (全菌株に 1 コピーずつ保存されている遺伝子) を 263 個抽出し、マルチプルアライメントを行った (54)。Gblock でギャップを取り除いた後 (55)、RAxML にてコアゲノムに基づく系統樹を作成した。系統樹は、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 7.0.21) を用いて描画した。

Table 1. 解析に用いたゲノムデータの一般的な特徴

Strains	Source	ID ^a	Genome status ^b	Size (Mbp)	No. of CDS	GC (%)	complete-contamination ^c	
							ness ^c	nation ^c
<i>L. delbrueckii</i> group								
<i>L. acetotolerans</i> DSM 20749 ^T	rice vinegar	ERR387527	D	1.57 ^d	1,518	36.2	98.71	0.70
<i>L. acidophilus</i> NCFM	human feces	GCA 000011985.1	C	1.99 ^d	1,875	34.7	99.35	0.16
<i>L. amyolyticus</i> DSM 11664 ^T	acidified beer wort	SRR1151257	D	1.54 ^d	1,574	38.3	99.03	0.16
<i>L. apis</i> Hma11	bee gut	GCA 000970735.1	D	1.72 ^d	1,564	35.8	98.71	0.16
<i>L. crispatus</i> DSM 20584 ^T	eye	GCA 001434005.1	D	2.06 ^d	2,017	36.6	98.39	0.81
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842 ^T	yogurt	GCA 000056065.1	C	1.86 ^d	1,900	49.7	99.03	0.00
<i>L. gasserii</i> ATCC 33323 ^T	gastrointestinal tract	GCA 000014425.1	C	1.89 ^d	1,808	35.3	98.87	0.77
<i>L. helsingborgensis</i> wkb8	honeybee stomach	GCA 000761135.1	C	1.72 ^d	1,735	36.7	98.06	0.65
<i>L. helveticus</i> CNRZ32	cheese	GCA 000422165.1	C	2.23	2,407	36.9	98.87	0.16
<i>L. iners</i> DSM 13335 ^T	human urine	GCA 000160875.1	D	1.28 ^d	1,191	32.3	97.74	0.34
<i>L. jensenii</i> DSM 20557 ^T	vaginal discharge	SRR1151162	D	1.62 ^d	1,478	34.3	99.03	0.16
<i>L. johnsonii</i> NCC 533	human feces	GCA 000008065.1	C	1.99 ^d	1,875	34.6	98.71	0.24
<i>L. kefirifaciens</i> ZW3	Tibet kefir grain	GCA 000214785.1	C	2.35	2,420	37.4	99.03	0.81
<i>L. kimbladii</i> Hma2 ^T	honeybee stomach	GCA 000970775.1	D	2.19	1,972	35.8	97.74	0.78
<i>L. kullabergensis</i> Biut2 ^T	honeybee stomach	GCA 000967195.1	D	2.18	1,943	35.5	97.10	0.78
<i>L. melloventris</i> Hma8 ^T	honeybee stomach	GCA 000970775.1	D	2.12	1,994	35.8	97.74	0.97

Table 1. 解析に用いたゲノムデータの一般的な特徴

Strains	Source	ID ^a	Genome		No. of CDS	GC (%)	complete-ness ^c	contamination ^c
			status ^b	Size (Mbp)				
<i>L. salivarius</i> group								
<i>L. animalis</i> DSM 20602 ^T	human plaque	ERR387553	D	1.87 ^d	1,812	41.1	99.14	0.48
<i>L. equi</i> DSM 15833 ^T	horse feces	ERR387509	D	2.24	2,159	39.0	98.39	1.64
<i>L. murinus</i> DSM 20452 ^T	rat gut	ERR387504	D	2.16	2,030	40.0	99.09	0.16
<i>L. ruminis</i> ATCC 27782	cow feces	GCA_000224985.1	C	2.07	1,978	43.5	99.35	0.70
<i>L. salivarius</i> UCC118	human ileum	GCA_000008925.1	C	2.13	2,101	33.0	99.03	0.48
<i>L. satsumensis</i> DSM 16230 ^T	shochu mash	ERR433495	D	2.63	2,441	39.9	98.17	0.48
<i>L. alimentarius</i> group								
<i>L. alimentarius</i> DSM 20249 ^T	pickled fish	ERR387471	D	2.33	2,232	35.4	99.14	1.45
<i>L. farciminis</i> DSM 20184 ^T	sausage	GCA_001434775.1	D	2.48	2,417	36.4	99.14	3.28
<i>L. brevis</i> group								
<i>L. brevis</i> ATCC 367	silage	GCA_000014465.1	C	2.34	2,281	46.1	99.03	0.24
<i>L. paucivorans</i> DSM 22467 ^T	brewery environment	GCA_001437125.1	D	2.36	2,210	49.1	99.35	0.16
<i>L. buchneri</i> group								
<i>L. buchneri</i> CD034	silage	GCA_000298115.2	C	2.56	2,424	44.2	99.14	1.21
<i>L. hilgardii</i> ATCC 8290 ^T	tomato	GCA_000159315.1	D	2.72	2,548	38.2	99.03	0.16
<i>L. sakei</i> group								
<i>L. curvatus</i> DSM 20019 ^T	milk	SRR1151125	D	1.81 ^d	1,814	41.9	98.71	0.16
<i>L. sakei</i> 23K	French sausage	GCA_000026065.1	C	1.88 ^d	1,849	41.3	98.71	0.24

Table 1. 解析に用いたゲノムデータの一般的な特徴

Strains	Source	ID ^a	Genome status ^b	Size (Mbp)	No. of CDS	GC (%)	complete-contamination ^c	
							ness ^c	ness ^c
<i>L. reuteri</i> group								
<i>L. equigenerosi</i> DSM 18793 ^T	horse feces	SRR1151138	D	1.60 ^d	1,545	42.6	98.55	0.81
<i>L. fermentum</i> F-6	raw milk	GCA_000397165.1	C	2.06 ^d	2,022	51.7	98.47	0.24
<i>L. pontis</i> DSM 8475 ^T	rye sourdough	SRR1151252	D	1.66 ^d	1,614	53.5	97.18	0.40
<i>L. reuteri</i> JCM 1112 ^T	gastrointestinal tract	GCA_000010005.1	C	2.04 ^d	2,020	38.9	99.35	1.13
<i>L. vaginalis</i> DSM 5837 ^T	vagina	SRR1151175	D	1.78 ^d	1,733	40.5	99.35	0.16
<i>L. fructivorans</i> group								
<i>L. florum</i> DSM 22689 ^T	flower	GCA_001436645.1	D	1.35 ^d	1,302	41.1	99.17	0.60
<i>L. fructivorans</i> DSM 20203 ^T	spoiled sake	SRR1151190	D	1.37 ^d	1,336	38.9	98.69	1.03
<i>L. lindneri</i> JCM 11027 ^T	spoiled beer	GCA_001311115.1	D	1.44 ^d	1,632	34.1	97.77	0.06
<i>L. sanfranciscensis</i> TMW 1.1304	sourdough	GCA_000225325.1	C	1.38 ^d	1,402	34.8	98.06	0.43
<i>L. casei</i> group								
<i>L. casei</i> ATCC 393 ^T	cheese	GCA_000829055.1	C	2.95	2,890	47.9	99.35	0.16
<i>L. paracasei</i> JCM 8130 ^T	dairy product	GCA_000829035.1	C	3.02	2,945	46.6	99.35	0.48
<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	human intestine	GCA_000026505.1	C	3.01	2,817	46.7	98.87	0.27
<i>L. plantarum</i> group								
<i>L. collinoides</i> DSM 20515 ^T	fermenting apple juice	GCA_001435975.1	D	3.62	3,224	46.1	99.35	1.96
<i>L. pentosus</i> KCA1	vagina	GCA_000271445.1	C	3.43	3,039	46.3	99.03	2.00
<i>L. plantarum</i> WCFS1	human saliva	GCA_000203855.3	C	3.35	3,123	44.4	99.03	1.34

Table 1. 解析に用いたゲノムデータの一般的な特徴

Strains	Source	ID ^a	Genome status ^b (%)	No. of CDS	Size (Mbp)	complete-ness ^c	contamination ^c
<i>L. vaccinostercus</i> group							
<i>L. hokkaidonensis</i> LOOC260 ^T	silage	GCA 000829395.1	C 38.2	2,328	2.40	99.35	0.56
<i>L. rossiae</i> DSM 15814 ^T	wheat sourdough	GCA 000428925.1	D 43.3	2,700	2.86	99.35	2.10
<i>L. vaccinostercus</i> DSM 20634 ^T	cow feces	ERR387501	D 43.5	2,440	2.55	99.30	2.50
No group							
<i>L. apinorum</i> Fhon13 ^T	honeybee stomach	GCA 001281175.1	D 34.6	1,315	1.46 ^d	97.84	0.48
<i>L. composti</i> DSM 18527 ^T	compost	SRR1151200	D 43.9	3,306	3.46	97.37	1.02
<i>L. coryniformis</i> DSM 20001 ^T	silage	GCA 001433765.1	D 42.8	2,579	2.71	99.14	3.23
<i>L. dextrinicus</i> DSM 20335 ^T	silage	SRR1151201	D 38.0	1,725	1.81 ^d	99.03	4.50
<i>L. malefermentans</i> DSM 5705 ^T	beer	SRR1151262	D 41.0	2,013	2.05 ^d	99.35	3.28
<i>L. mellifer</i> Bin4 ^T	honeybee stomach	GCA 000970795.1	D 39.3	1,661	1.82 ^d	97.90	0.81
<i>L. mellis</i> Hon2 ^T	honeybee stomach	GCA 000967245.1	D 36.2	1,650	1.81 ^d	98.18	0.48
<i>L. ozensis</i> DSM 23829 ^T	flower	ERR433479	D 31.9	1,439	1.48 ^d	98.47	1.66
<i>L. rennini</i> DSM 20253 ^T	rennin	ERR433491	D 40.7	2,219	2.26	98.71	0.48

^a“GCA”はNCBIからアセンブリデータ、“DRR”、“ERR”と“SRR”はSRAからの取得していることを表す。

^bDはドラフトゲノム、Cはコンプリートゲノムを表す。

^ccompleteness および、contaminationはcheckMにて算出した。

^dゲノムサイズが2.06 Mbpより小さい菌種 (Small Genome lactobacilli) を示している。

Table 1. 解析に用いた *L. kunkeei* のゲノムデータの一般的な特徴

Strains	Source	ID ^a	Genome status ^b	Size (Mbp)	No. of CDS	GC (%)	complete-ness ^c	contamination ^c
<i>L. kunkeei</i>								
YH-15 ^T	Spoiled wine (United States)	GCA 001281265.1	D	1.52	1,353	37.2	97.90	0.81
AR114	Honey bee (Norway)	GCA 000830375.1	D	1.55	1,394	37.6	97.58	1.02
EFB6	Honey bee (Germany)	SRR1502204	D	1.54	1,381	37.8	97.58	0.48
FF30-6	<i>Apis mellifera</i> (Finland)	BDDX01000000	D	1.58	1,457	37.6	97.90	0.81
Fhon2	<i>Apis mellifera</i> (Sweden)	SRR1752126	D	1.55	1,417	36.9	97.90	0.48
LAan	<i>Apis andreiformis</i> (Malaysia)	GCA 001281225.1	D	1.55	1,404	37.9	97.58	0.91
LAce	<i>Apis cerana</i> (Malaysia)	GCA 001421115.1	D	1.53	1,368	38.0	97.58	0.48
LAdo	<i>Apis dorsata</i> (Malaysia)	GCA 001308205.1	D	1.41	1,271	37.3	97.90	0.59
LAFI	<i>Apis florea</i> (Thailand)	GCA 001421135.1	D	1.57	1,438	37.7	97.58	1.13
LAKo	<i>Apis koschevnikovi</i> (Malaysia)	GCA 001281205.1	D	1.55	1,383	38.4	97.90	0.81
LAla	<i>Apis laboriosa</i> (Nepal)	GCA 001281215.1	D	1.57	1,404	37.8	97.90	0.81
LAni	<i>Apis nigrocincta</i> (Indonesia)	GCA 001281285.1	D	1.50	1,338	38.0	97.58	0.48
LAnu	<i>Apis nuluensis</i> (Malaysia)	GCA 001308215.1	D	1.58	1,406	38.2	97.90	0.81
LMbe	<i>Melipona beecheii</i> (Mexico)	GCA 001308185.1	D	1.48	1,326	37.3	97.90	0.81
LMbo	<i>Meliponula bocandei</i> (Kenya)	SRR1752113	D	1.53	1,395	37.3	97.90	0.81
MP2	<i>Apis mellifera</i> (Chile)	GCA 000741865.1	D	1.58	1,428	37.5	97.90	1.45

^a“GCA”はNCBIからアセンブリデータ、“DRR”、“ERR”と“SRR”はSRAからの取得していることを表す。

^bDはドラフトゲノム、Cはコンプリートゲノムを表す。

^ccompleteness および、contamination は checkM にて算出した。

Table 1. 解析に用いた *Fructobacillus* 属のゲノムデータの一般的な特徴

Strains	Source	INSD/SRA Accession no.	Genome status ^b	Genome Size	No. of		GC (%)	complete- ness ^c	contami- nation ^c
					CDS	CDS			
<i>F. fructosus</i> NRIC 1058 ^T	Flower	BBXR01000000	D	1.49	1,437	44.6	93.62	0	
<i>F. durionis</i> DSM 19113 ^T	Fermented fruit	NZ_FOLI00000000	D	1.33	1,221	44.7	94.98	0.57	
<i>F. ficulneus</i> JCM 12225 ^T	Fig	BBXQ01000000	D	1.55	1,397	43.9	92.79	0.48	
<i>F. pseudoficulneus</i> DSM 15468 ^T	Fig	BBXS01000000	D	1.41	1,312	44.5	95.14	0.48	
<i>F. tropaeoli</i> F214-1 ^T	Flower	BBXT01000000	D	1.68	1,572	44.2	94.98	0.24	

^aD はドラフトゲノム、C はコンプリートゲノムを表す。

^bD はドラフトゲノム、C はコンプリートゲノムを表す。

^ccompleteness および、contamination は checkM にて算出した。

【結果と考察】

Illumina Genome Analyzer II を用いて、*L. kunkeei* FF30-6 株のドラフトゲノムを決定した。さらに、*L. kunkeei* のゲノムデータは既にデータベースに登録されている 15 株を取得した。11 の系統的グループとそれらに分類されていない菌群からグルコースの発酵様式や分離源によらず、57 菌種 57 菌株のそのほかの *Lactobacillus* 属細菌のゲノムデータも同様にして取得した。Table 1 上の ID は、GCA は NCBI のアッセンブリ済みのデータを表し、DRR、ERR、SRR は Sequence Read Archive (SRA) のデータであることを表しているが、いずれも DFAST にてアノテーションが行われている。Genome Status の C はコンプライトゲノム、D はドラフトゲノムであることを示す。

まず、今回の解析に用いた 73 菌株のゲノムデータの評価を checkM を用いて行ったところ、*L. kunkeei* 以外の *Lactobacillus* 属の Completeness は 97.77 から 99.35 (平均 98.72 ± 0.61) であったが、*L. kunkeei* の Completeness は 97.58 から 97.90 (平均 97.78 ± 0.16) であった (Table 1)。Completeness において *L. kunkeei* はほかの *Lactobacillus* 属に比べ、低く評価された。今回の解析に用いた 16 株全ての *L. kunkeei* は共通して 4 個の遺伝子マーカー (P-loop ATPase protein family, control of competence regulator ComK, sigma-54 modulation protein family and the S30AE family of ribosomal proteins, and leucyltRNA synthetase) が検出されていなかった。さらに、hydroxymethylglutarylcoenzyme A synthase は 16 株中 6 株で欠損していた。そのため、*L. kunkeei* のゲノムデータのクオリティーを評価するためパラメーターを “genus *Lactobacillus*” として checkM を実行すると、Completeness が低く評価されたことは、ゲノムデータのクオリティーが低いわけではなく、*L. kunkeei* が行ってきた進化の過程で、マーカー遺伝子を含む遺伝子を欠損させてきたことが原因であると考えられる。また、*Fructobacillus* 属も同様に近縁菌属であ

る *Leuconostoc* 属と比べ Completeness が低く、*Leuconostoc* 属の completeness が 97.3% から 100% (中央値: 99.04%) であるのに対し、*Fructobacillus* 属は 92.8% から 95.1% (中央値: 94.98%) であった (27)。

L. kunkeei 以外の *Lactobacillus* 属菌種 (Other lactobacilli) は 1.28 Mbp から 3.62 Mbp のゲノム、1,191 個から 3,224 個の遺伝子を持っており、非常に多様性に富んでいた (Fig. 4a, b)。一方で、*L. kunkeei* は 1.41 Mbp から 1.58 Mbp のゲノムに 1,271 個から 1,457 個しか CDS を持たず、そのほかの *Lactobacillus* 属菌種と比べると *L. kunkeei* のゲノムは非常に小さく、遺伝子数が少ないことが分かった (共に $P < 0.001$) (Fig. 4 a, b) (37)。一方で、*L. kunkeei* と非常によく似たフルクトース豊富な環境に生息している *Fructobacillus* 属菌種と *L. kunkeei* を比較したところ、ゲノムサイズと遺伝子数共に類似していた (Fig. 4 a, b)。また、ヒトヴァギナに生息している *Lactobacillus* 属細菌 (Vaginal lactobacilli; *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. vaginalis*) も、環境適応を行った結果、そのほかの環境に生息している *Lactobacillus* 属菌種と比べて、遺伝子数とゲノムサイズが明らかに小さいことが報告されている (56)。これは *Lactobacillus* 属細菌の環境適応の 1 つの方法として、ゲノムを小さくし、遺伝子を減らしてきたことを示唆している。16 菌株の *L. kunkeei* のコアゲノムは 1,128 個見つけられた。これは、*L. kunkeei* FF30-6 株が有している遺伝子の 77.4% にあたる。16 菌株の *L. kunkeei* のパンゲノムは 2,053 個であった (Fig. 5)。

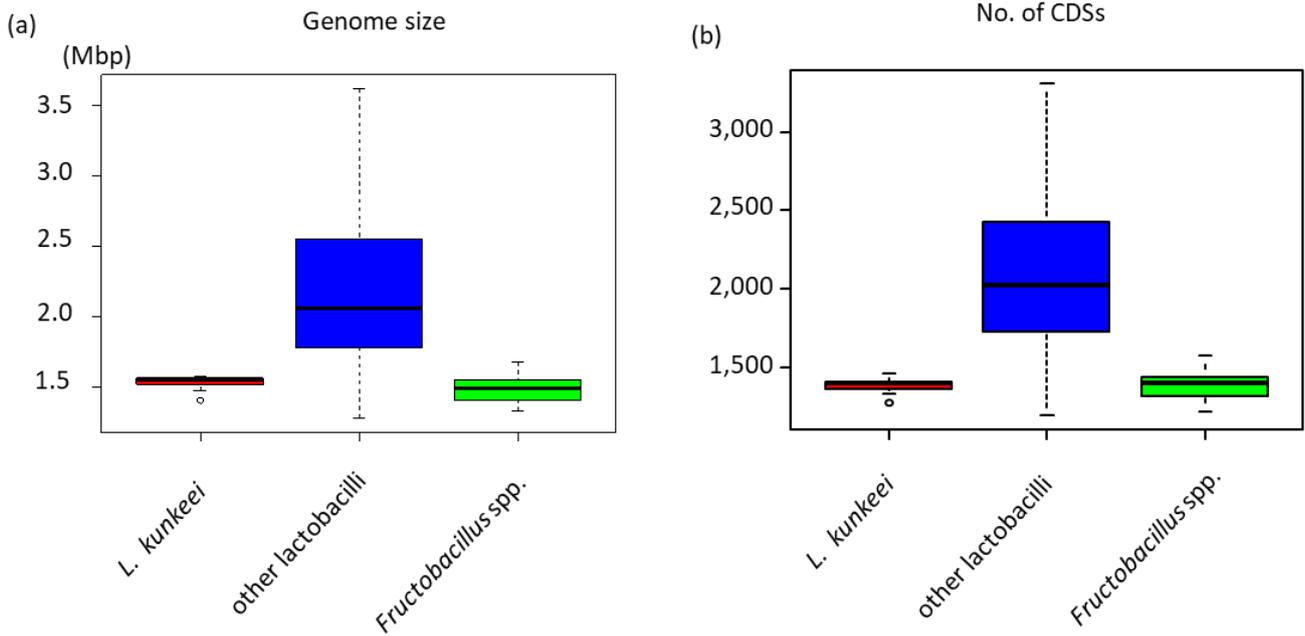


Fig. 4. 各グループのゲノムの基本的な特徴

a; *L. kunkeei*、other lactobacilli、*Fructobacillus* 属細菌のゲノムサイズ, b; それらの CDS 数を示した。

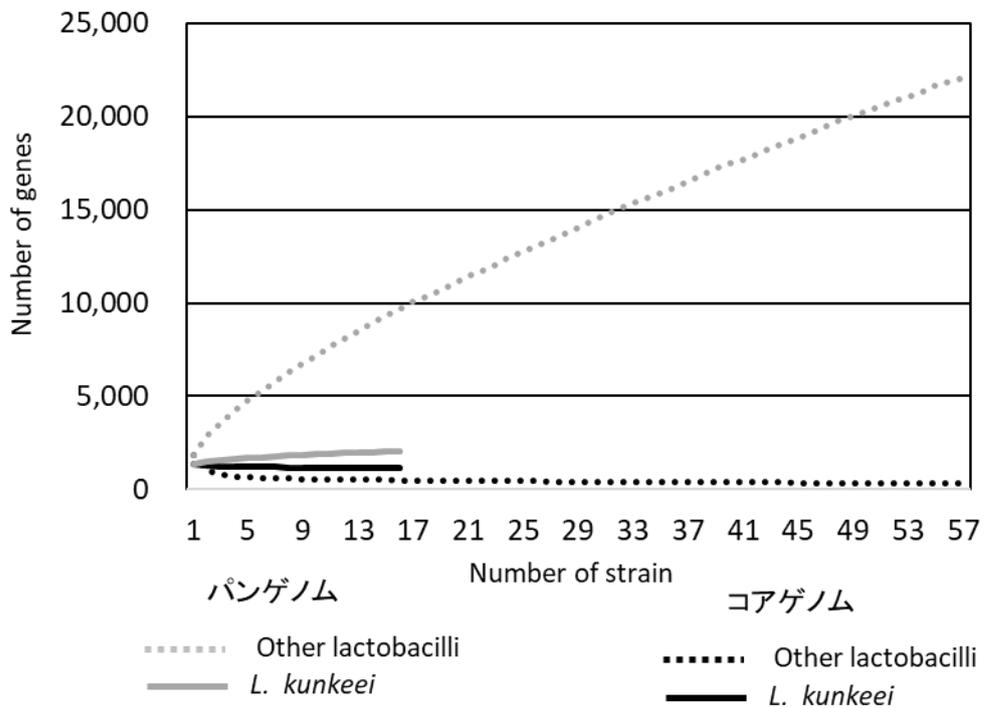


Fig. 5. *L. kunkeei* とその他の *Lactobacillus* 属のコアゲノムとパンゲノム

灰色の実線は *L. kunkeei* のパンゲノムを示し、点線はほかの *Lactobacillus* 属細菌のパンゲノムを示した。また、黒色の実線は *L. kunkeei* のコアゲノムを示し、点線はその他の *Lactobacillus* 属細菌のコアゲノムを示した。

以前は DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) を行うことや、16S rRNA、*recA* や *hsp60* といった遺伝子の相同性によって菌種判別が行われてきた (1)。しかしながら近年、シーケンス技術の進歩と低価格化により、これまでより簡便で実験者の技術的個人差が出ないゲノムデータによる細菌同定が行われるようになってきた。ゲノムデータを用いた細菌同定法の優位性と正確性を確かめるため、今回の解析に用いたゲノムデータを ANI と GGDC の 2 種類の方法により、*is silico* DDH を行い、菌種判断の妥当性を検討した。現在、ANI は 95% 以下を別菌種とし、GGDC では 70% 以下を別菌種としている(51, 52)。16 株の *L. kunkeei* を用いて試験したところ、ANI では 0.905 から 0.980 の値を示し、基準株に対する ANI を算出したところ、3 菌株が *L. kunkeei* と判断され、12 株は *L. kunkeei* とは別菌種と判断された。また、GGDC (formula 2) では基準株に対する GGDC を算出したところ 1 菌株が *L. kunkeei* で 14 株が *L. kunkeei* とは別菌種であると判断された (Table 2)。一方で、GGDC の formula 1 および、formula 3 では全 15 菌株で *L. kunkeei* であると判断された (Table 3)。この結果から *L. kunkeei* の菌種判断を行うにあたり、GGDC formula 2 を用いることは不適切である可能性が示唆された。次に、この *L. kunkeei* にみられた ANI 及び GGDC formula2 の値が菌種判断のためのボーダーを下回るという特徴は、ゲノムを小さくしている菌種に共通しているのかを明らかにするために、16 菌株の *Lactobacillus iners* のゲノムデータを用いて ANI を算出した (Table 4)。*L. iners* は *L. kunkeei* と同様に *Lactobacillus* 属細菌の中で最もゲノムが小さい菌種の一つで今回用いた *L. iners* のゲノムサイズの平均は 1.30 Mbp (標準偏差; ± 0.04 Mbp) であった。これらの菌株間の ANI を比較すると 0.986 から 1.000 の値を示し、いずれの菌株も基準株に対して 0.95 以上の値を示した (Table 4)。この結果から、*L. iners* は *L. kunkeei* と同様にゲノムサイズが非常に小さいが、ANI の値は基準株と同一菌種であることを示した。これらの結果は、*L. kunkeei* が菌種内

で多様性を持ち、菌株レベルで独自の進化を行っている可能性があることを示している (37)。

近年の生命情報科学の発展はめざましく、次世代シーケンサーによる解析が安価で容易になり、ANI や GGDC といった菌種判断のために用いることができる簡便なツールが開発されている。このような情勢を受けて、現在の乳酸菌の菌種同定においては 16S rRNA 遺伝子の相同性及び、ANI の結果から行われることが主流となりつつある。その結果、これまで長きにわたって用いられてきた「種の定義」が揺らぎつつある。さらに現在細菌分類の世界において「属の定義」が定められておらず、*Lactobacillus* 属細菌においては再分類など *Lactobacillus* 属乳酸菌の分類を見直す動きが出てきている (57)。現在行われている *in silico* 解析による菌種の判断はまだ完全な手法とは言うための議論は十分ではない。DDH や表現性状も考慮した従来の分類方法と *in silico* DDH の両方を用いて、包括的な判断を行う必要があると言える。

次に、遺伝子を機能ごとに分類し比較を行うことを検討したが、*Lactobacillus* 属のゲノムは非常に多様であり、そのまま比べるのは困難であると考えた。そこで、次節ではゲノムが小さい菌種を選抜し、それらと *L. kunkeei* の比較を行うこととした。

Table. 2. ANI と GGDC (formula 2) による *L. kunkeei* の *in silico* DDH

ANI	FF30-6	MP2	AR114	LAKo	LAla	LAan	YH-15	LAni	LMbe	LMbo	LAdo	LAnu	LAce	LAFI	EFB6	Fhon2
FF30-6	-															
MP2	0.950	-														
AR114	0.973	0.954	-													
LAKo	0.950	0.943	0.951	-												
LAla	0.963	0.943	0.958	0.951	-											
LAan	0.949	0.963	0.948	0.952	0.948	-										
YH-15	0.936	0.951	0.938	0.933	0.931	0.940	-									
LAni	0.947	0.960	0.947	0.951	0.948	0.980	0.939	-								
LMbe	0.938	0.954	0.945	0.934	0.932	0.941	0.980	0.939	-							
LMbo	0.946	0.944	0.946	0.950	0.941	0.947	0.942	0.944	0.944	-						
LAdo	0.915	0.913	0.914	0.918	0.916	0.916	0.905	0.915	0.907	0.913	-					
LAnu	0.949	0.943	0.948	0.971	0.949	0.951	0.931	0.950	0.932	0.949	0.918	-				
LAce	0.949	0.962	0.948	0.950	0.950	0.984	0.938	0.980	0.941	0.945	0.916	0.952	-			
LAFI	0.976	0.946	0.977	0.954	0.964	0.951	0.931	0.949	0.934	0.944	0.916	0.952	0.951	-		
EFB6	0.954	0.969	0.953	0.948	0.948	0.968	0.949	0.966	0.946	0.949	0.913	0.948	0.966	0.950	-	
Fhon2	0.936	0.953	0.941	0.932	0.929	0.939	0.976	0.936	0.979	0.942	0.906	0.931	0.938	0.930	0.945	-

GGDC _F2	FF30-6	MP2	AR114	LAKo	LAla	LAan	YH-15	LAni	LMbe	LMbo	LAdo	LAnu	LAce	LAFI	EFB6	Fhon2
FF30-6	100															
MP2	61.6	100														
AR114	78.3	63.2	100													
LAKo	60.8	56.7	61.3	100												
LAla	68.9	58.8	67.5	60.4	100											
LAan	60.3	69.3	60.2	61.5	59.9	100										
YH-15	53.2	61.0	54.2	51.4	51.4	55.5	100									
LAni	59.2	66.8	59.0	61.1	59.9	83.0	54.2	100								
LMbe	54.3	63.1	58.3	52.0	52.5	55.8	53.2	54.8	100							
LMbo	58.3	58.3	59.0	60.7	56.2	59.3	57.1	58.8	58.4	100						
LAdo	44.5	43.7	44.0	45.4	45.0	45.0	41.1	44.2	41.7	43.6	100					
LAnu	60.2	58.2	59.9	75.3	60.0	61.3	50.8	60.2	52.1	59.8	45.4	100				
LAce	59.6	68.2	59.6	60.6	60.5	86.8	54.0	82.2	55.6	58.2	44.8	60.7	100			
LAFI	78.2	59.3	80.3	62.3	69.5	61.8	51.2	60.4	52.8	57.1	44.7	61.5	61.3	100		
EFB6	62.7	73.2	61.8	59.1	59.8	72.8	59.9	71.4	58.0	59.7	43.4	58.3	71.3	60.8	100	
Fhon2	53.3	62.2	54.9	51.7	51.3	54.6	79.1	53.2	81.2	56.1	41.3	50.9	53.6	51.0	57.8	100

Table. 3. GGDC (formula 1) と GGDC (formula 3) の値による *L. kunkeei* の *in silico* DDH

GGDC _F1	FF30-6	MP2	AR114	Lako	LAla	LAan	LAni	LMbe	LMbo	LAdo	LAnu	LAce	LAfl	EFB6	Fhon2	YH-15 ^T
FF30-6	100															
MP2	86.6	100														
AR114	85.1	88.7	100													
Lako	89.2	85.5	88.5	100												
LAla	84.7	80.8	86.7	90.1	100											
LAan	86.5	86.0	87.3	88.5	83.9	100										
LAni	90.1	89.9	88.5	92.0	84.6	92.7	100									
LMbe	85.2	91.1	91.1	89.3	83.5	86.7	90.4	100								
LMbo	84.8	82.6	86.5	91.4	90.6	84.0	87.6	86.3	100							
LAdo	84.4	81.0	83.4	86.4	78.4	84.2	91.0	85.3	82.3	100						
LAnu	87.3	83.1	87.7	94.7	88.4	86.9	91.5	86.4	89.8	84.5	100					
LAce	92.3	88.4	87.2	91.4	83.6	91.7	97.0	88.7	86.3	88.4	92.3	100				
LAfl	92.2	86.3	86.5	89.3	85.0	83.8	88.8	85.4	84.7	85.0	86.4	87.1	100			
EFB6	88.0	89.7	88.3	89.6	83.6	90.1	94.4	89.6	87.6	88.1	89.0	93.3	86.8	100		
Fhon2	85.4	92.1	86.8	81.7	78.9	81.9	87.0	92.5	82.2	82.0	82.3	85.2	86.4	88.7	100	
YH-15 ^T	87.2	87.6	87.3	91.1	82.7	87.3	93.3	93.6	87.4	88.6	88.6	90.9	86.6	92.8	91.8	100

GGDC _F3	FF30-6	MP2	AR114	Lako	LAla	LAan	LAni	LMbe	LMbo	LAdo	LAnu	LAce	LAfl	EFB6	Fhon2	YH-15 ^T
FF30-6	100															
MP2	84.6	100														
AR114	86.9	86.7	100													
Lako	86.6	82.3	86.1	100												
LAla	84.7	79.0	86.0	87.2	100											
LAan	84.2	85.9	84.8	86.1	81.9	100										
LAni	86.9	88.6	85.5	88.9	82.4	93.6	100									
LMbe	81.4	88.8	87.5	84.1	79.4	83.1	85.8	100								
LMbo	82.2	80.4	83.8	88.3	86.5	81.8	84.7	83.5	100							
LAdo	77.0	73.9	76.0	79.1	72.3	77.0	82.5	76.4	74.9	100						
LAnu	84.8	80.8	85.1	94.1	85.7	84.7	88.4	81.6	86.8	77.5	100					
LAce	88.8	87.6	84.6	88.3	81.8	93.3	96.8	84.7	83.4	80.5	89.1	100				
LAfl	92.5	83.7	88.3	87.0	85.0	82.3	86.1	81.0	81.8	77.6	84.4	84.9	100			
EFB6	86.0	89.7	86.0	86.4	81.6	89.9	93.2	86.2	85.0	79.6	85.7	92.3	84.5	100		
Fhon2	81.1	89.3	82.8	77.6	75.1	78.7	82.5	93.2	79.4	73.6	77.8	73.6	81.2	85.3	100	
YH-15 ^T	82.6	85.3	83.1	85.4	78.3	83.5	88.2	94.3	84.1	78.9	83.0	86.0	81.4	89.4	92.3	100

Table 4. *Lactobacillus iners* の各菌株間の ANI

query	01V1-a	03V1-b	09V1-c	11V1-d	2503V10-D	7 1 47FAA	AB-1	ATCC 55195	LEAF 2052A-d	LEAF 2053A-b	LEAF 3008A-a	SPIN 1401G	UMB0033	UPII 143-D	UPII 60-B	DSM 13335 ^T
01V1-a	-															
03V1-b	0.988	-														
09V1-c	0.987	0.987	-													
11V1-d	0.988	0.988	0.986	-												
2503V10-D	0.987	0.987	0.989	0.988	-											
7 1 47FAA	0.986	0.988	0.987	0.987	0.988	-										
AB-1	0.988	0.989	0.987	0.988	0.987	0.987	-									
ATCC 55195	0.987	0.988	0.987	0.987	0.987	0.988	0.987	-								
LEAF 2052A-d	0.987	0.988	0.988	0.987	0.986	0.987	0.986	0.987	-							
LEAF 2053A-b	0.986	0.987	0.987	0.986	0.987	0.987	0.987	0.987	0.987	-						
LEAF 3008A-a	0.987	0.989	0.987	0.988	0.987	0.986	0.987	0.987	0.987	0.987	-					
SPIN 1401G	0.988	0.988	0.987	0.988	0.987	0.987	0.987	0.988	0.988	0.988	0.988	-				
UMB0033	0.986	0.988	0.987	0.987	0.986	0.986	0.987	0.986	0.988	0.987	0.986	0.987	-			
UPII 143-D	0.987	0.987	0.988	0.987	0.988	0.987	0.986	0.987	0.988	0.986	0.988	0.987	0.987	-		
UPII 60-B	0.988	0.988	0.987	0.988	0.987	0.987	0.987	0.987	0.988	0.988	0.987	0.989	0.988	0.986	-	
DSM 13335^T	0.988	0.989	0.987	0.987	0.987	0.987	1.000	0.988	0.986	0.988	0.988	0.987	0.987	0.986	0.988	-

第 2 節 ゲノムの小さい *Lactobacillus* 属と *L. kunkeei* のゲノム比較

前節の結果より、*Lactobacillus* 属は非常に多様なゲノム構造が見られたので、ゲノムが小さい *L. kunkeei* との比較のため、ゲノムサイズが小さい *Lactobacillus* 属を集め、ゲノム構成の比較を行った。また、ゲノムの小さい *Lactobacillus* 属を系統群ごとや分離源ごとにグルーピングし、さらに詳細なゲノムの比較解析を行った。

【実験方法】

1. 小さいゲノムの *Lactobacillus* 属細菌の選抜とグループ分け

ゲノムサイズが 57 株の中央値である 2.07 Mbp 以下の *Lactobacillus* 属菌種 (Small genome lactobacilli) を 29 菌株選抜した。さらにゲノムの小さい菌種の中で、ヒトヴァギナにから分離された 5 菌種 (*Lactobacillus vaginalis*、*Lactobacillus jensenii*、*Lactobacillus iners*、*Lactobacillus crispatus*、*Lactobacillus gasseri*) (56)、ミツバチより分離された 5 菌種 (*Lactobacillus apis*、*Lactobacillus apinorum*、*Lactobacillus helsingborgensis*、*Lactobacillus mellifer*、*Lactobacillus mellis*) をそれぞれ vaginal lactobacilli、bee-associated lactobacilli とした (58)。

2. 遺伝子の機能分類に基づくゲノムデータの解析とそれらの統計処理

Lactobacillus kunkeei と *Lactobacillus* 属の遺伝子を機能ごとに分類し比較するために、COGNITOR software を用いて Cluster of Orthologues Groups (COG) を決定した (59)。代謝経路予測を KEGG Automatic Annotation Service (KAAS) を用いて行い、様々な経路にかかわる遺伝数を調べた (60)。KAAS の “GENES data set” として sce, pfa, eco, sty, hin, pae, nme, hpy, rpr, mlo, bsu, sau, lla, spn, cac, mge, mtu, ctr, bbu, syn, aae, mja, afu, pho, ape, llm, lpl, lca, lcb, lbr, lre, lrf, lsa, lhe, lfe, ppe, efa, ooe,

lme, wko の 40 菌種を用いた。生物種 3 文字記号の生物種の詳細は以下に記載した (Table 5)。また KAAS により予測された代謝系遺伝子の有無とその保持数を用いて群平均法による階層クラスタリングを R を用いて行った。さらに、*L. kunkeei* が有する特異的代謝関連遺伝子 (もしくは特異的代謝関連欠損遺伝子) を明らかにするために KEGG により予測された代謝関連遺伝子を用いて特異的遺伝子の推定を行った。*L. kunkeei* の全株が保有している代謝関連遺伝子のうち、そのほかのゲノムが小さい *Lactobacillus* 属菌種が 5 菌種 (20%) 以下しか有していない遺伝子を *L. kunkeei* 特異的代謝関連遺伝子とし、*L. kunkeei* が全株有しておらず、そのほかのゲノムが小さい *Lactobacillus* 属菌種のうち 24 菌種 (80%) 以上が有している遺伝子を *L. kunkeei* の特異的代謝関連欠損遺伝子とした (Table 6)。2 群間の有意差検定は Mann-Whitney U テストを行い (61)、3 群以上の有意差検定には Kruskal-Wallis テストを行ったのちに、post-hoc テストを行った。 p 値が 0.05 以下の時に有意差があると判断した。これらの有意差検定は Windows IBM SPSS (Version 21.0.Armonk, NY: IBM Corp.) を用いた。

Table 5. KAAS で用いた “GENES data set”

Sce; *Saccharomyces cerevisiae*
Pfa; *Plasmodium falciparum* 3D7
eco; *Escherichia coli* K-12 MG1655
sty; *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* servar Typji CT18
hin; *Haemophilus influenzae* Rd KW20
pae; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
nme; *Neisseria meningitidis* MC58 (serogroup B)
hpy; *Helicobacter pylori* 26659
rpr; *Rickettsia prowazekii* Madrid E
mlo; *Mesorhizobium loti*
bsu; *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168
sau; *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* N315
lla; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* llo 1403
spn; *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (virulent serotype 4)
cac; *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824
mge; *Mycoplasma genitalium* G37
mtu; *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
ctr; *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX
bbu; *Borrelia burgdorferi* B31
syn; *Synechocystis* sp. PCC 6803
aae; *Aquifex aeolius*
mja; *Methanocaldococcus jannaschii*
afu; *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304
pho; *Pyrococcus horikoshii*
ape; *Aeropyrum pernix*
llm; *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363
lpl; *Lactobacillus plantarum* WCFS1
lca; *Lactobacillus paracasei* ATCC 334
lcb; *Lactobacillus casei* BL23 (*Lactobacillus paracasei*)
lbr; *Lactobacillus brevis* ATCC 367
lre; *Lactobacillus reuteri* DSM 20016jcm1112
lrf; *Lactobacillus reuteri*
lsa; *Lactobacillus sakei*
lhe; *Lactobacillus helveticus* DPC 4571
lfe; *Lactobacillus fermentum* IFO 3956

ppe; *Pediococcus pentosus* ATCC 25745

efa; *Enterococcus faecalis* V583

ooe; *Oenococcus oeni*

lme; *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293

wko; *Weissella koreensis*

Table 6. *Lactobacillus kunkeei* 特異的代謝関連遺伝子と特異的代謝関連欠損遺伝子の定義

	<i>L. kunkeei</i>	Small genome lactobacilli
<i>L. kunkeei</i> 特異的代謝関連遺伝子	100% (=16 strains)	<20% (< 5/29)
<i>L. kunkeei</i> 特異的代謝関連欠損遺伝子	0%	>80% (>24/29)

3. FF30-6 株特異的遺伝子の探索および菌株特異的プライマーの作成

Lactobacillus kunkeei の中でも FF30-6 株は我々がハチプロバイオティクスとしての機能を期待している菌株で、今後の研究の発展のために菌株特異的プライマーを作成しておくことが望まれた。まず、*L. kunkeei* のオルソログなタンパクをデータより抽出するために、GET_HOMOLOGUES software (version1.3) を用いて、すべてのタンパク質のオーソログを調べた (53)。その後、自作スクリプトにてデータを処理し、FF30-6 株のみが有しており、ほかの株が保存していないタンパク質の LOCUS tag を基に、300 bp 程度の産物が増幅されるプライマーを作成した。

【結果と考察】

Table 1 上のゲノムサイズに記載される上付き “d” はゲノムが小さい菌種であることを示しており、これらは 57 菌種の *Lactobacillus* 属細菌の中央値である 2.07 Mbp 以下の菌種を選抜・抽出した (Table 1)。まず、それぞれの遺伝子を COGNITOR software を用いて、機能ごとに遺伝子を 21 クラスに分類した。Table 7 は *Lactobacillus* 属細菌を各系統群やいくつかの分離源ごとに分類し、COG class を表記したものである。環境特異的な進化を考察するために、*Fructobacillus* 属が入れられている。まず、small genome lactobacilli と *L. kunkeei* のゲノムサイ

ズと CDS 数を比較したところ、有意に *L. kunkeei* はゲノムサイズが小さく、遺伝子数が少なかった ($p < 0.001$) (Fig. 6)。*L. kunkeei* とゲノムが小さいほかの *Lactobacillus* 属細菌のゲノム中の遺伝子の構成を比較するために COG に基づき遺伝子を分類し、それぞれの細菌群のゲノムを構成する遺伝子を集計した。各群の遺伝子数 (Table 8)、また全遺伝子に対する割合 (Table 9)、*L. kunkeei* とゲノムが小さい *Lactobacillus* 属細菌、*L. fructivorans* group、vaginal lactobacilli、bee-associated lactobacilli の 4 群とそれぞれ有意差検定した (Fig. 7)。まず、*L. kunkeei* と *Lactobacillus* 属細菌の遺伝子構成を比較すると、明らかに *L. kunkeei* は糖代謝に関する遺伝子群 (Carbohydrate transporter and metabolism; class G) が少ないことが示された。ゲノムが小さい *Lactobacillus* 属細菌群の中で糖代謝にかかわる class G は 2 番目に割合が多い遺伝子群であるにもかかわらず (8.0%)、*L. kunkeei* の class G は 8 番目に多い遺伝子群となっていた (5.6%) (Table 9)。さらに、遺伝子数でみると *L. kunkeei* はゲノムが小さい *Lactobacillus* 属細菌に比べ 93 個もの遺伝子を減らしていることが明らかとなった (Table 8)。一般的な乳酸菌は多様な環境に生息するために様々な糖を代謝する能力を有しているが、*L. kunkeei* は代謝可能な糖の種類が限られているという表現性状を有しており、この表現性状と今回のゲノム解析の結果は合致していた (20)。*L. kunkeei* の class G 遺伝子の割合は *L. fructivorans* group とはほとんど差がない (Table 8)、一方で Vaginal lactobacilli、Bee-associated lactobacilli よりも有意に少ないことが明らかとなった ($p < 0.05$) (Fig. 7)。*L. florum* はグルコースを生育基質とした時に比べ、フルクトースを生育基質にした場合により早い生育を見せるという特徴を持つ通性 FLAB として知られている (62)。このような特徴を持つ *L. florum* は *L. fructivorans* group に分類されており、*L. fructivorans* group の数菌種はグルコースを糖源とする培地では生育が遅いことが知られている (62-64)。また、*L. kunkeei* と同様に *L. fructivorans* group に分類される *L. florum* 以外の細菌も特異的な環境に生息して

いることが知られており、*Lactobacillus sanfranciscensis* はサワードウ (65)、*Lactobacillus lindneri* はビールから見出されている (66)。*L. kunkeei* と *L. fructivorans* group は糖代謝関連遺伝子という点においては非常によく似たゲノム構成であったが、COG の 21 クラスのうち、エネルギー生産にかかわる遺伝子群 (Energy production and conversion; class C)、脂質代謝にかかわる遺伝子群 (Lipid transport and metabolism; class I) をはじめとする 12 クラスで有意差が見出された (Fig. 7)。

L. kunkeei はミツバチ消化管といったフルクトース豊富な環境に生息しており、*Lactobacillus* 属細菌の中にはミツバチ消化管より分離されている乳酸菌も多く報告されている (58, 67)。そこで、*L. kunkeei* とよく似たゲノムの構造を有しているのか 2.07 Mbp 以下のミツバチ消化管より分離された *Lactobacillus* 属細菌 (bee-associated lactobacilli) と比較した。*L. kunkeei* と bee-associated lactobacilli では 21 クラス中 11 クラスで有意差が認められ ($p < 0.05$) (Fig. 8)、特に class G は *L. kunkeei* は 70 個程度 (ゲノム全体の 5.8%) であったのに対し、bee-associated lactobacilli では 150 個 (ゲノム全体の 10.0%) の class G 遺伝子を有しており、その遺伝子数は *L. kunkeei* の倍以上であった (Fig. 8, Table 8, 9)。bee-associated lactobacilli と *L. kunkeei* はほとんど同じ環境中に生息しているが、類似した進化や環境適応をしてきたのではなく、異なる進化をたどっていることが明らかとなった。また、ヒトのヴァギナに生息する *Lactobacillus* 属細菌はゲノムサイズを小さくしていることが明らかにされている (56)。そこで、同様にゲノムサイズが小さい *L. kunkeei* と比較した。その結果、21 クラス中 16 クラスで有意差が認められ ($p < 0.05$) (Fig. 8)、全く異なるゲノムの構造を有していることが明らかとなった。これらの結果から、*Lactobacillus* 属細菌はゲノムを小さくする過程で、一様に同じゲノムレベルの進化を行ってきたのではなく、フルクトース豊

富な環境で *L. kunkeei* は独自の進化を遂げていることが強く示唆された。

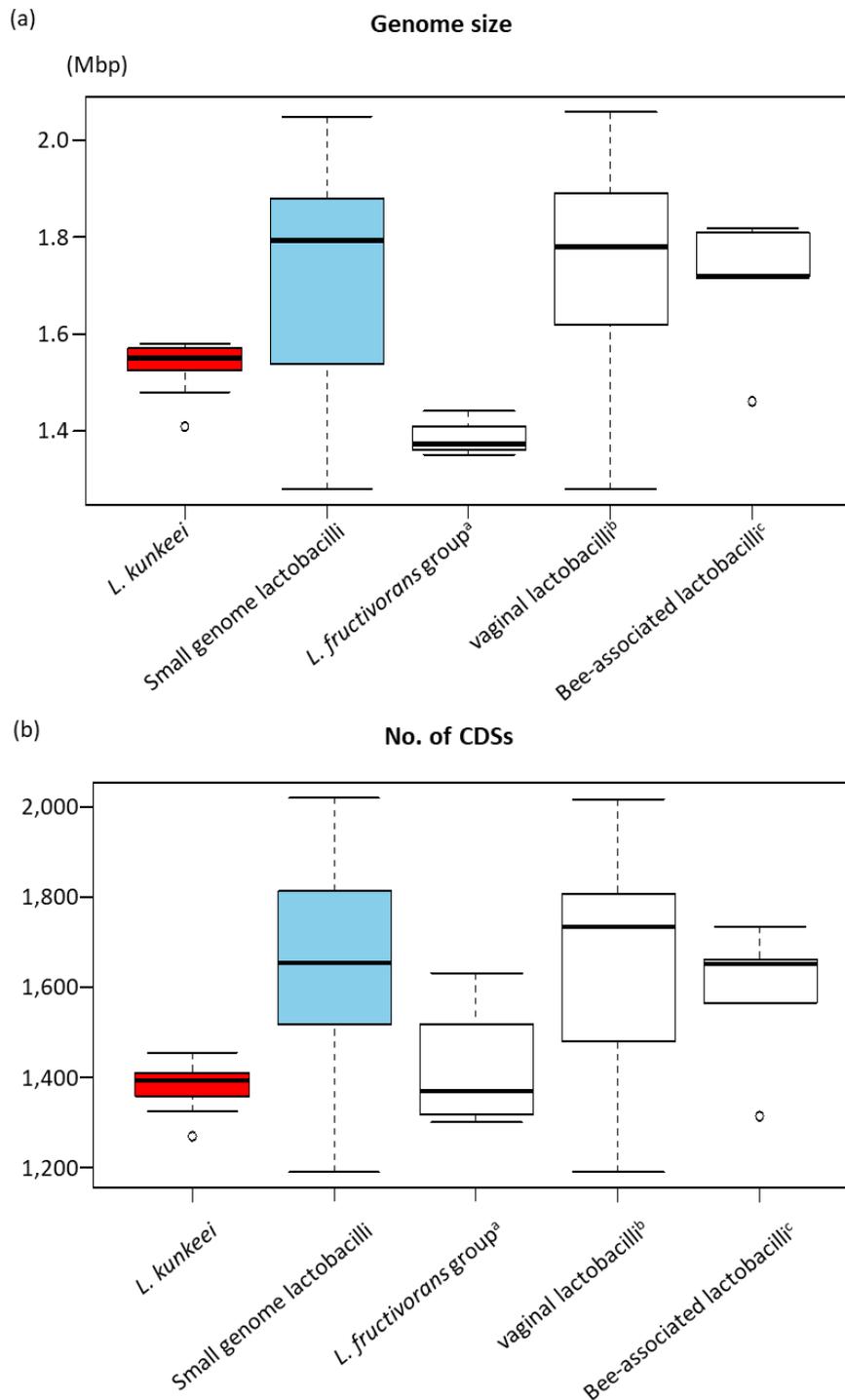


Fig. 6. *Lactobacillus kunkeei*、ゲノムが小さい *Lactobacillus* 属細菌、*L. fructivorans* group、vaginal lactobacilli、Bee-associated lactobacilli のゲノムサイズと遺伝子数

a; *L. sanfranciscensis*, *L. lindneri*, *L. florum*, *L. fructivorans*

b; *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. vaginalis*

c; *L. apis*, *L. apinorum*, *L. helsingborgensis*, *L. mellis*, *L. mellifer*

Table. 7. COG の class 名

-
- [C] Energy production and conversion
 - [D] Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
 - [E] Amino acid transport and metabolism
 - [F] Nucleotide transport and metabolism
 - [G] Carbohydrate transport and metabolism
 - [H] Coenzyme transport and metabolism
 - [I] Lipid transport and metabolism
 - [J] Translation, ribosomal structure and biogenesis
 - [K] Transcription
 - [L] Replication, recombination and repair
 - [M] Cell wall/membrane/envelope biogenesis
 - [N] Cell motility
 - [O] Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
 - [P] Inorganic ion transport and metabolism
 - [Q] Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
 - [R] General function prediction only
 - [S] Function unknown
 - [T] Signal transduction mechanisms
 - [U] Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
 - [V] Defense mechanisms
 - [X] Mobilome: prophages, transposons
-

Table 8. 各細菌群の遺伝子を機能ごとに分類した、それぞれの遺伝子機能群の平均遺伝子数

	<i>L. kunkeei</i> (n = 16)	Small genome lactobacilli ^a (n = 29)	<i>L. fructivorans</i> group (n = 4)	Vaginal lactobacilli ^b (n = 5)	Bee associated lactobacilli ^c (n = 5)
[C]	37	79	52	53	55
[D]	38	38	32	33	36
[E]	116	151	103	108	111
[F]	69	82	73	68	67
[G]	71	164	72	133	150
[H]	46	74	55	53	61
[I]	46	68	53	46	54
[J]	185	197	190	188	186
[K]	85	157	80	109	115
[L]	87	113	104	104	91
[M]	84	118	87	105	89
[N]	12	13	9	10	10
[O]	54	63	41	53	50
[P]	45	76	51	54	50
[Q]	11	16	8	9	15
[R]	80	116	71	88	84
[S]	95	136	85	102	105
[T]	34	72	36	57	46
[U]	13	15	12	12	13
[V]	26	64	31	59	47
[X]	10	61	37	26	10

^aゲノムサイズが2.07 Mbp以下の *L. kunkeei* 以外の *Lactobacillus* 属菌種

^bVaginal lactobacilli には *L. iners*、*L. jensenii*、*L. crispatus*、*L. gasseri*、*L. vaginalis* が含まれている。

^cBee-associated lactobacilli には *L. apis*、*L. apinorum*、*L. helsingborgensis*、*L. mellis*、*L. mellifer* が含まれている。

Table 9. 各群の機能ごとに遺伝子を分類した時の全遺伝子に対する割合

	<i>L. kunkeei</i> (n = 16)	Small genome lactobacilli ^a (n = 29)	<i>L. fructivorans</i> group (n = 4)	Vaginal lactobacilli ^b (n = 5)	Bee associated lactobacilli ^c (n = 5)
[C]	3.0	3.9	4.0	3.6	3.7
[D]	3.0	2.3	2.5	2.3	2.4
[E]	9.3	7.7	8.0	7.2	7.7
[F]	5.6	5.0	5.7	4.7	4.7
[G]	5.7	8.0	5.6	9.1	10.0
[H]	3.7	3.9	4.3	3.6	3.9
[I]	3.7	3.6	4.1	3.1	3.5
[J]	14.9	12.8	14.9	13.1	13.1
[K]	6.8	7.5	6.3	7.3	8.0
[L]	7.0	6.9	8.1	7.1	6.6
[M]	6.8	6.6	6.8	7.1	6.4
[N]	1.0	0.7	0.7	0.6	0.8
[O]	4.4	3.5	3.2	3.6	3.5
[P]	3.6	3.9	4.0	3.6	3.5
[Q]	0.9	0.7	0.6	0.6	0.9
[R]	6.4	6.0	5.6	6.0	5.9
[S]	7.6	7.1	6.6	6.8	7.4
[T]	2.8	3.6	2.8	3.9	3.1
[U]	1.0	0.9	1.0	0.8	1.0
[V]	2.1	3.2	2.4	4.0	3.2
[X]	0.8	2.4	2.9	1.7	0.7

^aゲノムサイズが2.07 Mbp以下の *L. kunkeei* 以外の *Lactobacillus* 属菌種

^bVaginal lactobacilli には *L. iners*、*L. jensenii*、*L. crispatus*、*L. gasseri*、*L. vaginalis* が含まれている。

^cBee-associated lactobacilli には *L. apis*、*L. apinorum*、*L. helsingborgensis*、*L. mellis*、*L. mellifer* が含まれている。

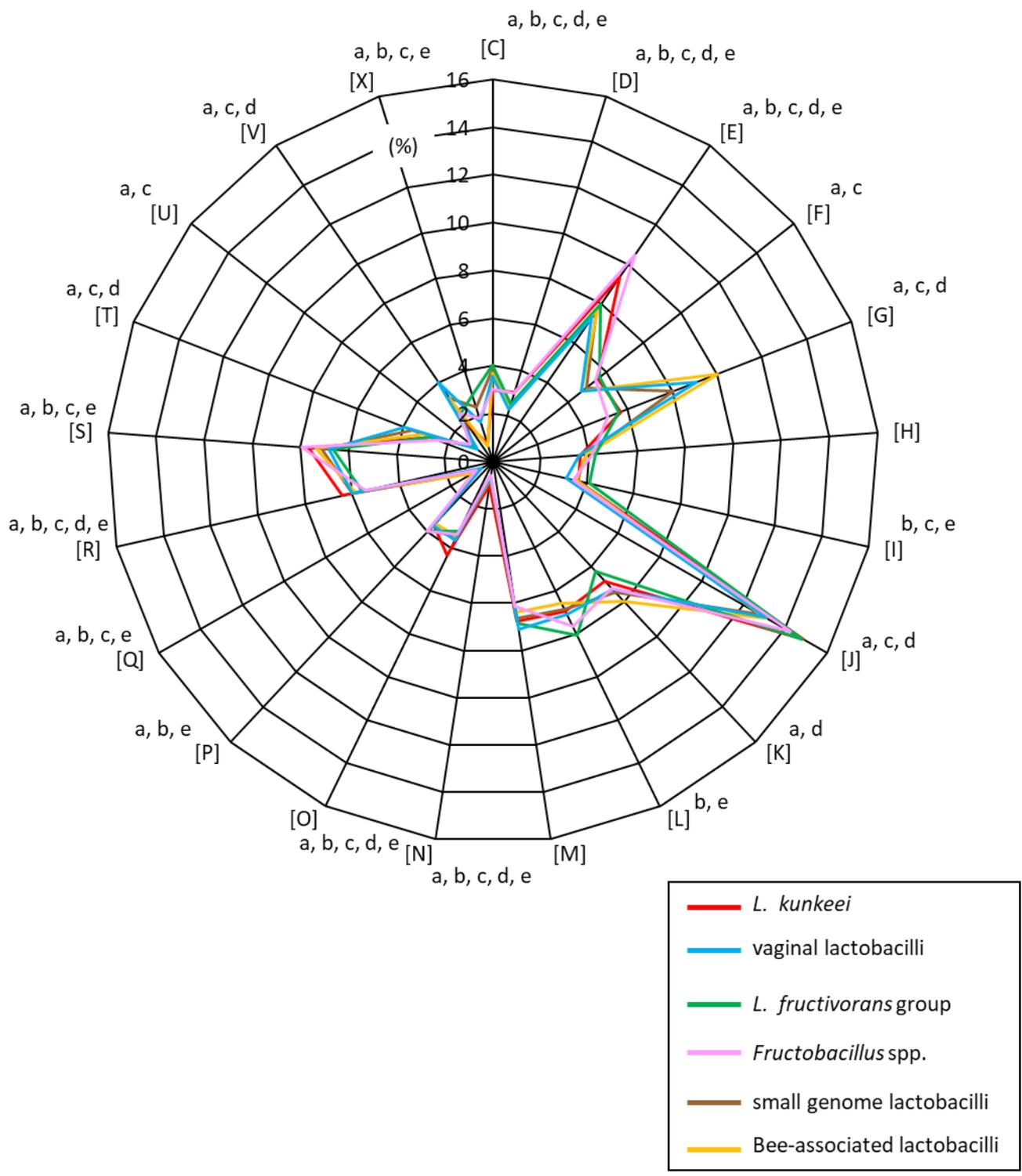


Fig. 7. 各乳酸菌群の遺伝子においてそれぞれの機能クラスが占める割合
 Kruskal–Wallis test と post-hoc によって *L. kunkeei* とそのほかの群に 5% 以下の有意差が存在するのかが評価した。各項目の上のアルファベットは以下の群との有意差があれば記している。
 a; small genome lactobacilli, b; *L. fructivorans*, c; vaginal lactobacilli, d; bee-associated lactobacilli, e; *Fructobacillus* spp. を示した。

次に、KAAS を用いて詳細に各細菌の代謝、生合成の経路を比較した。一般的に乳酸菌は通性嫌気性細菌で嫌気環境を好むことはよく知られており、*Lactobacillus* 属細菌は今回の解析からも呼吸鎖を有していないことが示された (Table 10)。一方で、FLAB は好気条件下で非常に旺盛な生育を見せる (Fig. 1a) (20)。しかしながら、*L. kunkeei* は TCA cycle (tricarboxylic acid cycle) や ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis と呼ばれる呼吸鎖を持たないことが明らかとなった。このことから、酸素を呼吸に用いているのではなく、電子受容体として用いていることが強く示唆された (Table 10)。また、*L. kunkeei* は乳酸菌の主要な糖の取り込み系の一つである PTS (phosphotransferase system) を完全に欠損させ、糖を含めた様々な物質の取り込みを担う ABC transporter も、*L. kunkeei* はゲノムが小さい *Lactobacillus* 属細菌と比較して有意にその数を減らしていた ($p < 0.001$) (Table 10)。*L. kunkeei* が保持する ABC transporter を詳細に解析したところ、糖の取り込みに関わると考えられる ABC transporter は保持しておらず、無機金属塩やアミノ酸の取り込みに関わる ABC transporter しか有していなかった (Table 10)。また、取り込み系の欠損のみならず、fructose and mannose metabolism や galactose metabolism と呼ばれる糖代謝経路の遺伝子数をゲノムが小さい *Lactobacillus* 属細菌に比べ有意にそれらの数を減らしていた (いずれも $p < 0.001$) (Table 10)。これらの *L. kunkeei* が有している代謝関連遺伝子の保有状況は、*L. kunkeei* の糖代謝能が乏しい原因の一つを示していることが考えられた。*L. kunkeei* はゲノムを小さくしているばかりではなく他のゲノムが小さな *Lactobacillus* 属細菌と比較して biosynthesis of amino acid や fatty acid biosynthesis は有意にその関連遺伝子数を多く保持していた ($p \leq 0.001$) (Table 10)。例えば、ミツバチは 12 日をピークにして、日齢と共に中腸内の遊離脂肪酸量を減少させ (68)、消化管内で炭素数の多い脂肪酸 (ワックス) を生合成していることが知られている (69, 70)。*L. kunkeei* はその環境中で栄養として遊離

脂肪酸を獲得するために、これらの遺伝子数を多く保持している可能性が考えられ、FLAB の独自のゲノムの特徴はフルクトース豊富な環境で適応する過程で獲得した特徴であることが考えられた。一方で、bee-associated lactobacilli は *L. kunkeei* と比較して fructose and mannose metabolism や galactose metabolism をゲノム中に多く有しており、ほかにも PTS や ABC transporter など保持遺伝子数の特徴は *L. kunkeei* の特徴とは異なっていた (Table 10)。これはミツバチ消化管内に生息する *Lactobacillus* 属細菌が一様にゲノムを小さくして適応しているのではなく、*Lactobacillus* 属細菌は複数の進化の方向性を持つことで、菌種間に多様性を持たせている可能性が示唆された。

COG によるゲノムの構造解析で、*L. fructivorans* group は *L. kunkeei* と類似したゲノム構造を有していたが、代謝関連遺伝子に着目しても PTS を完全に欠損しており、fructose and mannose metabolism や galactose metabolism といった糖の取り込みや代謝に関わる遺伝子の数の特徴は非常によく似ていた。しかしながら、アミノ酸や脂肪酸の生合成経路関連遺伝子は *L. kunkeei* より少なく *L. kunkeei* と *L. fructivorans* group は糖代謝関連遺伝子の数の特徴は非常に似ているが、そのほかの代謝関連経路の特徴は同様ではなかった (Table 10)。また、Vaginal lactobacilli の平均ゲノムサイズは約 1.6 Mbp と *L. kunkeei* と同程度であったが (Fig. 6)、特異的な糖代謝関連遺伝子の特異的な欠落がなく、*L. kunkeei* とは異なった特徴を有していた。これらの結果から、*Lactobacillus* 属細菌はゲノムサイズを小さくするという退行的進化の過程で、すべての菌種が同じ順番で遺伝子を欠落させているのではなく、それぞれの環境に適応した進化を行って生きている可能性が示唆された。また、フルクトース豊富な環境の中でも同一の進化を行っているのではなく、多様な表現性状を獲得していた。その中で、*L. kunkeei* はフルクトース豊富な環境で糖代謝関連遺伝子を欠落させるという独自の進化を行っていた。

Table 10. 様々な代謝経路に用いられる各乳酸菌群の遺伝子数

Pathway definition	<i>L. kunkeei</i>	Small genome lactobacilli	<i>L. fructivorans</i> group	Vaginal lactobacilli ^a	Bee-associated lactobacilli ^b	<i>Fructobacillus</i> spp.	<i>p</i> -value
Citrate cycle (TCA cycle)	2.0 (0) ^c	3.5 (2.0)	1.0 (0)	3.4 (1.5)	3.4 (2.1)	0 (0)	< 0.001
Fructose and mannose metabolism	2.0 (0)	10.3 (6.0)	4.0 (0.8)	10.4 (4.2)	15.8 (9.0)	2.8 (0.8)	< 0.001
Galactose metabolism	5.0 (0)	11.7 (4.2)	7.0 (0.8)	15.2 (3.4)	11.4 (5.7)	5.8 (0.8)	< 0.001
Fatty acid biosynthesis	11.3 (0)	7.7 (4.6)	11.8 (0.5)	3.6 (4.1)	7.4 (4.9)	11.0 (0)	0.001
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	1.5 (0.5)	2.0 (1.9)	3.5 (3.4)	2.0 (1.9)	2.4 (2.2)	1.0 (0)	0.458
Oxidative phosphorylation	10.6 (0.5)	11.7 (1.4)	12.0 (1.4)	12.4 (1.5)	11.4 (1.5)	9.2 (0.4)	0.002
Purine metabolism	45.4 (2.3)	41.2 (5.2)	40.0 (3.6)	38.2 (5.5)	38.8 (4.8)	42.0 (5.5)	0.045
Tetracycline biosynthesis	4.0 (0)	2.5 (2.0)	4.0 (0)	0.8 (1.8)	2.4 (2.2)	4.0 (0)	0.003
Lysine biosynthesis	13.0 (0)	9.4 (4.2)	12.0 (0)	7.8 (5.4)	10.4 (3.6)	12.2 (0.4)	< 0.001
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	13.0 (0)	19.6 (4.6)	13.5 (1.7)	20.6 (4.0)	18.6 (4.5)	11.2 (0.4)	0.001
Pyruvate metabolism	16.3 (0.5)	13.6 (3.9)	15.8 (1.0)	13.6 (3.9)	15.4 (3.0)	12.0 (1.0)	0.012
Biotin metabolism	5.0 (0)	3.4 (2.0)	5.0 (0)	1.6 (1.9)	3.0 (1.9)	4.0 (0)	< 0.001
2-Oxocarboxylic acid metabolism	6.6 (3.5)	2.7 (2.5)	2.3 (0.5)	1.4 (0.9)	2.8 (1.1)	8.4 (4.6)	< 0.001
Fatty acid metabolism	11.5 (0.5)	7.7 (4.6)	11.8 (0.5)	3.6 (4.2)	7.4 (4.9)	10.0 (0)	0.001
Biosynthesis of amino acids	45.2 (9.1)	35.4 (10.7)	34.0 (5.4)	30.0 (9.1)	34.4 (8.2)	61.4 (14.2)	< 0.001
ABC transporters	25.9 (1.6)	34.4 (6.9)	28.0 (5.0)	35.4 (5.0)	35.4 (3.8)	33.8 (3.1)	< 0.001
Two-component system	13.0 (0)	20.4 (5.5)	17.5 (1.9)	19.8 (5.4)	21.8 (8.0)	19.4 (1.1)	< 0.001
Phosphotransferase system (PTS)	0 (0)	11.3 (8.9)	0.3 (0.5)	14.2 (6.6)	17.4 (12.4)	0.4 (0.5)	< 0.001

^aVaginal lactobacilli は *L. iners*, *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. vaginalis* を含む。

^bBee-associated lactobacilli は *L. apis*, *L. apinorum*, *L. helsingborgensis*, *L. mellifer*, *L. mellis* を含む。

^c各値はそれぞれの群の平均値と標準偏差である。

Kruskal-Wallis テストにより検定を行った。

次に、KAAS による代謝経路予測のデータを利用して、代謝関連遺伝子の有無及び、その保持数を基に階層クラスタリングを行った (Fig. 8)。FLAB の代表菌群である *Fructobacillus* 属細菌は *Leuconostocaceae* 科に分類されるため、この解析には 27 菌種 27 菌株の *Leuconostocaceae* 科乳酸菌 (*Leuconostoc* 属、*Oenococcus* 属、*Convivina* 属、*Weissella* 属、*Fructobacillus* 属) のゲノムデータも加え、*Lactobacillus* 属細菌と同様に KAAS により代謝経路予測を行った。このクラスタリングでは類似した代謝関連遺伝子を保持している場合、同一のクラスターに収束し、系統的に近縁な関係にある細菌同士が類似した代謝関連遺伝子を保持しているため、同一のクラスターに収束することを予想した。クラスタリングを行った結果 *L. kunkeei* と *Fructobacillus* 属細菌は系統的に遠縁であるにもかかわらず、近くに収束した。*Fructobacillus* 属細菌は同じ *Leuconostocaceae* 科に分類される *Oenococcus* 属細菌や *Leuconostoc* 属細菌とは遠いクラスターにクラスタリングされていた (Fig. 8)。このクラスタリングの結果から、FLAB である *Fructobacillus* 属細菌と *L. kunkeei* は系統的には遠縁であるが、フルクトース豊富な環境によって誘導され、非常に類似した代謝関連遺伝子を保存していることが強く示唆された。

今回のクラスタリングの結果、*L. kunkeei* と *Fructobacillus* 属細菌は同一のクラスターに収束せず、これらの間に *L. fructivorans* group の一部の細菌 (*L. lindneri*、*L. fructivorans*、*L. florum*) と *Convivina intestini* が収束していた。先に記したように、*L. fructivorans* や *L. lindneri* はグルコースを糖源とする培地で生育が非常に遅く (31, 63)、また *L. florum* は通性 FLAB として報告されている (62)。これらの菌種はそれぞれ特異的な環境で生息しており、グルコースを糖源とする培地で生育が遅いという点で *L. kunkeei* と非常によく似た特徴を有しているため、*L. kunkeei* と同一のクラスターに収束したことが考えられた。また、*C. intestini* は近年マルハナバチから分離された乳酸菌で、*Fructobacillus* 属細菌同様フルクトース

豊富な環境に生息している (71)。しかし、FLAB 特有のグルコースを糖源とした培地で生育しないという特徴や糖代謝能が乏しいという特徴は有していない (71)。本菌はゲノムサイズが 1.60 Mbp で、遺伝子数が 1,509 個と *Fructobacillus* 属細菌と同様に、非常に小さなゲノムを有している (Accession No. NZ_QEKT00000000) (unpublish data)。今回のクラスタリングで *C. intestini* が *Fructobacillus* 属と隣り合ってクラスタリングされたが (Fig. 7)、これはゲノムサイズを小さくし、フルクトース豊富なハチ消化管内というよく似た環境に適応する過程で、類似した代謝系を保持している為であると考えられる。

一方で、*L. kunkeei* と同様にミツバチの消化管内に生息する *Lactobacillus* 属細菌 (Firm-5 lactobacilli、Frim-4 lactobacilli) は *L. kunkeei* と同様のクラスターに収束しなかった。先の COG や KAAS の結果も踏まえると、フルクトースが豊富という環境が必ずしも、*Lactobacillus* 属細菌に同じ進化を誘導するのではないということが明らかとなり、*L. kunkeei* はフルクトース豊富な環境で独自の進化を遂げていることが明らかとなった。

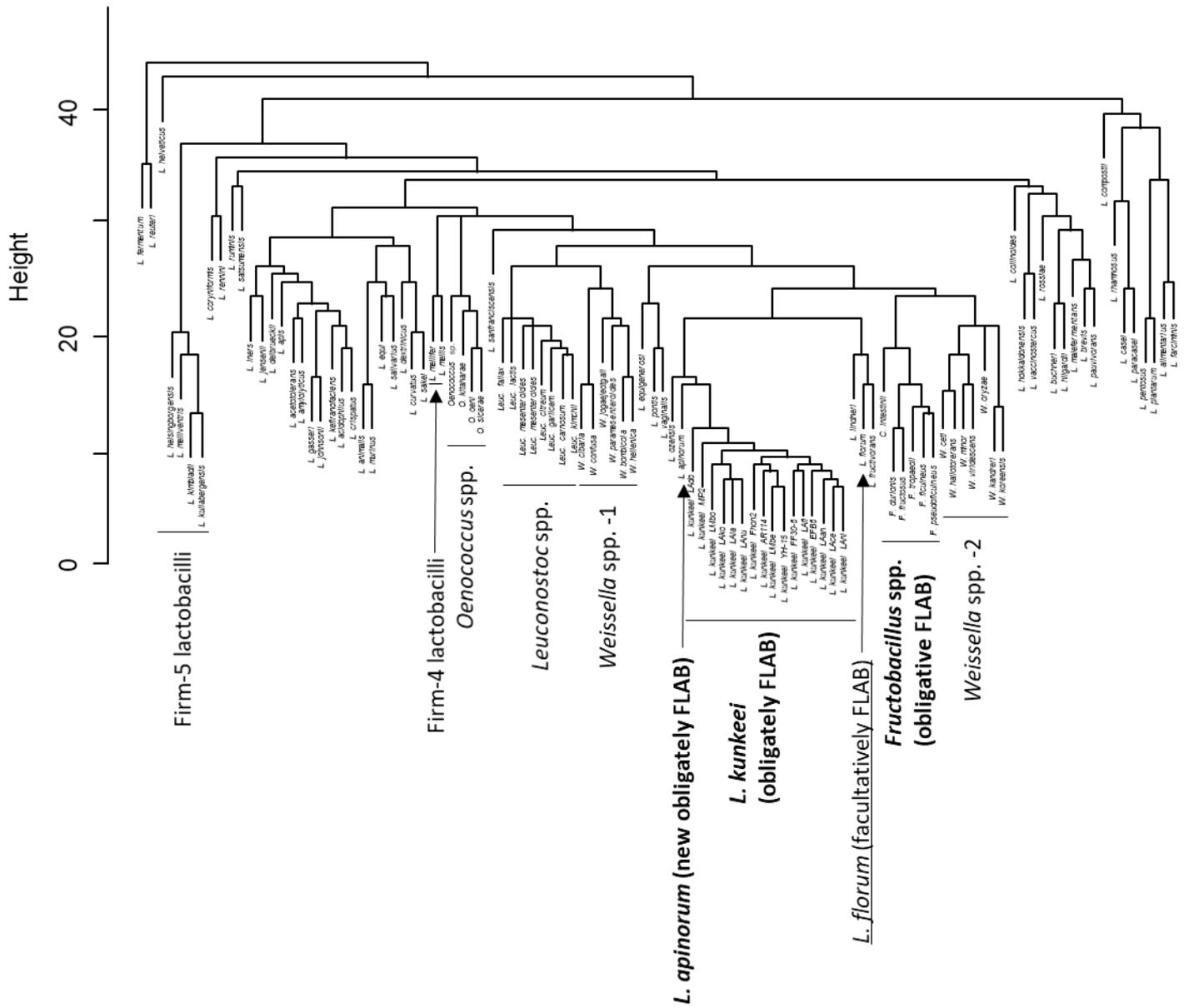


Fig. 8. *Lactobacillus* 属細菌と *Leuconostocaceae* 科乳酸菌の KEGG を基に代謝経路遺伝子を予測し、その保持数をクラスタリングしたデンドログラム

次に、KAAS の結果を基にして、*L. kunkeei* のゲノムを特徴付けるために *L. kunkeei* の特異的代謝関連遺伝子 (specific genes) と、特異的に欠損させてきた代謝関連遺伝子を (specifically missing genes) 決定した。KAAS ではゲノムが小さい *Lactobacillus* 属細菌と *L. kunkeei* が保持する代謝関連遺伝子としてのべ 1,986 個の遺伝子がアノテーションされ、*L. kunkeei* の特異的代謝関連遺伝子が 17 個見出され、*L. kunkeei* の特異的代謝関連欠損遺伝子は 10 個見出された (Table 11)。ゲノムが小さく、代謝関連をシンプルにしている *L. kunkeei* の特異的遺伝子よりも特異的代謝関連欠損遺伝子の方がよりその遺伝子数が少なかった理由の一つは *L. kunkeei* は同一菌種内であるので、保持している遺伝子が画一的であったためであると考えられる。また、その一方で比較対象であるゲノムが小さな *Lactobacillus* 属細菌が多様であり、そのためコア遺伝子が少なくなったことが原因であると考えられる。このそれぞれの細菌群の特異的代謝関連遺伝子の中には先の研究で行われた *Fructobacillus* 属と *Leuconostoc* 属の比較ゲノム解析において、*Fructobacillus* 属特異的遺伝子として見出された NADH oxidase も含まれていた (27)。また *L. kunkeei* の特異的代謝関連遺伝子であった、 β -N-acetylhexosaminidase は *Bifidobacterium* 属ではヒトミルクオリゴ糖の代謝に用いられることが明らかにされているが (72)、近年 *Lactobacillus plantarum* において自己溶解酵素として機能していることが明らかにされている (73)。今回の研究では *L. kunkeei* において、 β -N-acetylhexosaminidase が特異的遺伝子であることは明らかになったが、まだどのような役割を果たしているのか明らかにされていない。テイコ酸の輸送とストレス耐性に関する遺伝子も *L. kunkeei* 特異的な遺伝子として見出された。*L. kunkeei* は先の KAAS の結果からゲノムが小さい *Lactobacillus* 属細菌と比較して、two component system の保持数が少ないが、*ciaH* と *ciaR* の二つの two component system を特異的に有していた。*ciaH* と *ciaR* は緑膿菌 *Pseudomonas phumoniae* で見出される two component system の一つで、

バイオフィルムの生産量の調整をはじめ様々な遺伝子発現に関与し、外部刺激に応答することが明らかにされているが (74, 75)、*L. kunkeei* 内ではどのような機能をしているのか明らかにされていない。一方で、*L. kunkeei* 特異的代謝関連欠損遺伝子のうち糖代謝代謝関連遺伝子は 4 つ含まれていた (Table 11)。また、COG や KAAS の結果は、*L. kunkeei* のゲノム中にアミノ酸の代謝輸送に関する遺伝子が多いことが示されたが、グルタミン酸の輸送系に関する遺伝子は欠損していた (Table 11)。

Table 11. *L. kunkeei* の特異的代謝関連遺伝子と特異的代謝関連欠損遺伝子

specific genes	DPM1; dolichol-phosphate mannosyltransferase [EC:2.4.1.83] K07449; similar to archaeal holliday junction resolvase and Mrr protein APEH; acylaminoacyl-peptidase [EC:3.4.19.1] E1.6.99.1; NADPH2 dehydrogenase [EC:1.6.99.1] aspA; aspartate ammonia-lyase [EC:4.3.1.1] emrB; MFS transporter, DHA2 family, multidrug resistance protein B pfpl; protease I [EC:3.2.-.-] K06872; uncharacterized protein ciaH; two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase CiaH [EC:2.7.13.3] ciaR; two-component system, OmpR family, response regulator CiaR HEXA B; hexosaminidase [EC:3.2.1.52] E1.11.1.9; glutathione peroxidase [EC:1.11.1.9] pheB; chorismate mutase [EC:5.4.99.5] tagG; teichoic acid transport system permease protein E2.4.1.5; dextransucrase [EC:2.4.1.5] cah; carbonic anhydrase [EC:4.2.1.1] tagH; teichoic acid transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.40]
specifically missing genes	rbsK, RBKS; ribokinase [EC:2.7.1.15] K06958; UPF0042 nucleotide-binding protein yggT; YggT family protein E3.1.11.2, xthA; exodeoxyribonuclease III [EC:3.1.11.2] htpX; heat shock protein HtpX [EC:3.4.24.-] MPG; DNA-3-methyladenine glycosylase [EC:3.2.2.21] PTS-EI.PTSl, ptsl; phosphotransferase system, enzyme I, PtsI [EC:2.7.3.9] radC; DNA repair protein RadC pepP; Xaa-Pro aminopeptidase [EC:3.4.11.9] E5.3.1.8, manA; mannose-6-phosphate isomerase [EC:5.3.1.8]

次に、オルソログクラスタリングを行い、*L. kunkeei* のコアゲノムとアクセサリ遺伝子を決定した。16 株の *L. kunkeei* が 1 コピーずつ有している遺伝子をコアゲノムとすると、*L. kunkeei* のコアゲノムは 1,128 遺伝子あり、*L. kunkeei* の平均 CDS 数のうち 70% に相当した。我々がハチプロバイオティクス候補菌株として注目しているミツバチ消化管由来の *L. kunkeei* FF30-6 株とほかの 15 株の *L. kunkeei* のゲノムを比較した。FF30-6 株が有している 1,457 遺伝子のうち 15 個の遺伝子を FF30-6 株特異的遺伝子とした (Table 12)。FF30-6 株のミツバチプロバイオティクスとして利用するための可能性を検討するための研究がより発展するように、FF30-6 株の特異的遺伝子から菌株特異的プライマーの作成を試みた。15 個の特異的遺伝子を基に FF30-6 株に特異的プライマーを作成した (FF30-6-0188-F: 5'-CAATTGCTACAACCTTTCCAGTT-3'; FF30-6-0188-R: 5'-CTTCATGATGAGCCATTGGA-3')。作成したプライマーの検証を行う為にフィンランド、東京、網走でミツバチ消化管から分離された *L. kunkeei* の DNA および、ミツバチ消化管混和物から抽出した DNA を用いて PCR を行った。その結果、いくつかのフィンランド由来株の *L. kunkeei* の DNA サンプルを増幅させたが、東京および網走の *L. kunkeei* の DNA サンプルは増幅しなかった。フィンランド由来株はすべて同じ分離源であったことから、FF30-6 株と同一または、派生株である可能性が考えられ、本実験により、菌株特異的プライマーの作成に成功したと考えられる。

Table 12. *Lactobacillus kunkeei* FF30-6 の特異的遺伝子

Locus tag	Product
FF306 00124	hypothetical protein
FF306 00155	hypothetical protein
FF306 00171	hypothetical protein
FF306 00178	hypothetical protein
FF306 00179	hypothetical protein
FF306 00188	hypothetical protein
FF306 00406	hypothetical protein
FF306 00502	hypothetical protein
FF306 00603	tRNA-Asn
FF306 00739	hypothetical protein
FF306 01042	transposase
FF306 01075	hypothetical protein
FF306 01349	hypothetical protein
FF306 01339	peptide methionine sulfoxide reductase
FF306 01340	DNA-entry nuclease

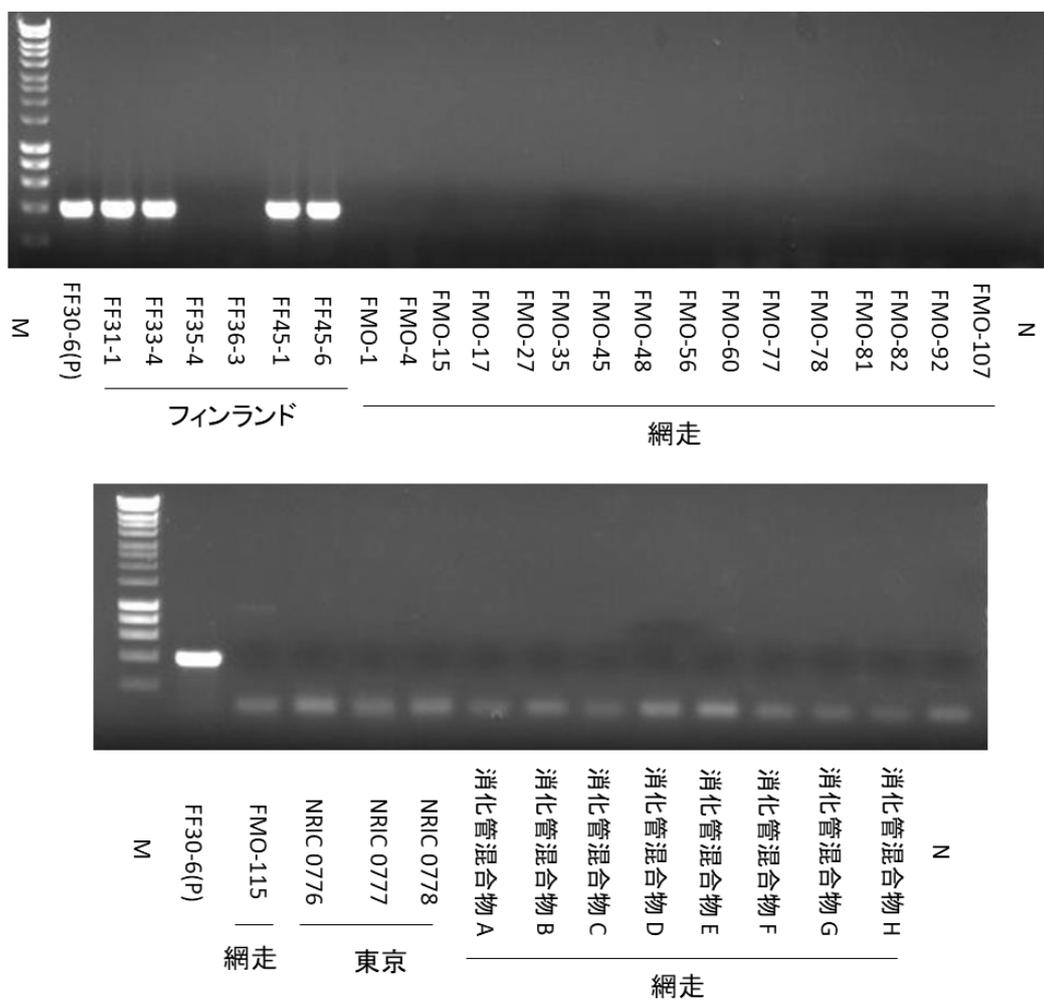


Fig. 9. FF30-6 株特異的プライマーの評価

p; positive control, N; negative control, M; Hyper ladder Marker 1 kb

第 3 節 *Lactobacillus kunkeei* の *adhE* の特徴

これまで、*Fructobacillus* 属のフルクトフィリックな特徴は *adhE* の欠損により、酸化還元バランスを保てないことが原因であると強く示唆されてきた。しかし、*L. kunkeei* の *adhE* についてはこれまで全く研究されておらず、*L. kunkeei* がどうしてフルクトフィリックな特徴を有しているのか明らかにされていない。そこで、*L. kunkeei* の *adhE* に着目して、ゲノムデータを基に解析を行った。また、発現解析や酵素活性測定といった生化学的解析も行った。

【実験方法】

1. *Lactobacillus kunkeei* のゲノムデータから *adhE* の探索及び、当該遺伝子の保存状態の確認

本解析に用いた *L. kunkeei* のゲノムデータから *adhE* を BLASTP 検索を行い、そのほかのヘテロ発酵を行う *Lactobacillus* 属と比較し、探索を行った。その後、それぞれを比較し遺伝子のドメイン解析を行った。

2. NADH oxidase、Adh、Aldh 活性試験のための粗酵素液の調整

まず、酵素液の調整を行った。*L. kunkeei* FF30-6 株及び *Lactobacillus apinorum* JCM 30765^T 株、*L. florum* NRIC 1071^T 株は、5 mL の GYP 培地に -80°C から接種し、30°C で一晩振とう培養 (120 rpm) を行った後、200 mL の GYP 培地に移し、もう一晩静置培養を行った。その培養液にさらに、700 mL の GYP 培地を加え、一晩静置培養を行った。菌体回収後、培養液と等量の 1 mM EDTA 添加 0.5 mM potassium Phosphate buffer (pH8.0) で菌体洗浄し、湿菌体重量を測定した。湿菌体重量の 2 倍量の 1 mM EDTA、1 mM PMSF 添加 0.5 mM Potassium phosphate buffer

(pH 7.0) で懸濁した。菌液に 0.3 g の ガラスビーズ (0.1 mm) を加えミニビード
ビーター 3110BX (Bio Spec Products; アメリカ合衆国) で 30 秒間 4,800 rpm で
破砕、30 秒間氷冷を 5 セット繰り返し、4°C で 10,000 rpm、1 分間遠心分離し
た後の培養上清を粗酵素液とした。

コントロールとしてヘテロ発酵乳酸菌である *Leuconostoc mesenteroides* NRIC
1541^T 株を用いた。5 mL の GYP 培地に -80°C から接種し、30°C で一晩静置培
養を行った後、200 mL の GYP 培地に移し、もう一晩静置培養を行った。その後、
同様に回収と調整を行った。

3. Adh/Aldh 活性測定

試験菌体がもつ Adh、Aldh とコントロールの NADH oxidase の 3 つの酵素の
酵素活性試験を行った。それぞれの活性は NADH が 340 nm の紫外線を良く吸
光する特徴を用いて、NAD から NADH (NADH から NAD) へと還元 (酸化) し
た時の 340 nm の吸光度を測定し、その変化量から酵素活性の値を求めた。酵素
活性測定を行う反応液の全量は 1 mL とした。

活性測定のコントロールとして NADH oxidase の測定を行った。NADH oxidase
の活性測定は、1 mM EDTA 添加 0.5 mM Potassium phosphate buffer (pH 7.0) に 40
mM NADH と 50 μ L 粗酵素液を加え、速やかにピペッティング後 60 秒間のタ
イムスキャンを行った (76)。NADH oxidase は NADH を酸化させ NAD を生産
するので ($\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$)、活性がある場合、吸光度 340 nm は
下降する。その時の 1 分間の吸光度の変化を ΔA とした。

Adh 活性測定は 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に 500 mM NAD、100mM Ethanol
と 50 μ L 粗酵素液を加え、速やかにピペッティング後 60 秒間のタイムスキャン
を行った (26)。Adh はエタノールをアセトアルデヒドに酸化する際に NAD^+
を還元させるので ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$)、活性がある

場合、吸光度 340 nm は上昇する。その時の 1 分間の吸光度の変化を ΔA とした。

Aldh 活性測定は 800 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に 800 mM NAD、0.2 mM CoA-SH、5 mM Acetaldehyde、1 mM DTT と 50 μ L 粗酵素液を加え、速やかにピペッティング後 60 秒間のタイムスキャンを行った (77)。Aldh はアセトアルデヒドをアセチル CoA に酸化する際に NAD⁺ を還元させるので ($\text{CH}_3\text{CHO} + \text{NAD}^+ \text{CoA} \rightarrow + \text{acetyl-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+$)、活性がある場合、吸光度 340 nm は上昇する。その時の 1 分間の吸光度の変化を ΔA とした。

$$\frac{\Delta A \times 1000}{6.3 \times 50} \cong \Delta A \times 3.17$$

ΔA : 60 秒間の 340 nm の吸光度の変位

1000: 酵素活性測定的全反応液量 (μ L)

6.3: NADH の吸光係数

50: 粗酵素液量 (μ L)

4. FF30-6 株の *adhE* 遺伝子の発現解析

L. kunkeei FF30-6 株は GYP 培地で振とう培養を 30°C で一晩前培養を行った。振るグロースに達した各培養液を 2 mL の GYP 培地に 1/50 量 (400 μ L) を接種し、3、6、18 時間後に RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN) を用いて、RNA を固定させたのち、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA 抽出を行った。固定化したサンプルは -20°C で保存し、2 週間以内に使用した。抽出した RNA を ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて逆転写を行い、PCR で発現を観察した。また、遺伝子発現のコントロールとして Glucokinase (*glk*)、Acetate kinase (*ack*)、16S rRNA の遺伝子も解析を行った。コントロール遺伝子が

グルコース代謝における役割 (Fig. 10)、プライマーは以下のテーブルに示した (Table 13)。PCR 反応液は 2.5 μ L の 10 \times Thermopol buffer, 2 μ L の 2.5mM dNTP, 0.1 μ L の 100 pmol/ μ L primer, 0.15 μ L の taq polymerase, 1 μ L の temprate DNA, 19.15 μ L の dH₂O (PCR grade) と調整した (Table 14a)。逆転写後、*glk* と *ack*、*adhE* の増幅は 94°C で 5 分間の予備的な熱変性のあと、94°C で 30 秒間の熱変性、55°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 45 秒間の伸長反応を 35 サイクル行い、72°C で 3 分間完全に伸長させた後 4°C で保存した (Table 14b)。16S rRNA を増幅するために 94°C で 30 秒間の熱変性、55°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 90 秒間の伸長反応を 35 サイクル行い、72°C で 2 分間完全に伸長させた後 4°C で保存した (Table 14c)。

Table 13. 本章で用いたプライマーの用途と配列

プライマー名	増幅産物 (bp)	塩基配列 (3'→5')	使用用途
FF30-6- <i>adhE</i> -EXP-F	250	CGGAATTGAGGTGCCAGAAG	<i>adhE</i> の遺伝子発現解析
FF30-6- <i>adhE</i> -EXP-R		GATACGGCAGGCCTTCATCTT	
FF306- <i>glk</i> -F	240	GAATGGGAAGTCCAGGTTCA	<i>glk</i> の遺伝子発現解析
FF306- <i>glk</i> -R		CGATAACACCTCCACCAACA	
FF306- <i>ackA</i> -F	246	GTTGCCGGTGGTGAATACTT	<i>ack</i> の遺伝子発現解析
FF306- <i>ackA</i> -R		AGCTTTGTGATCGCGGTAGT	
FF30-6 0188-F	400	CAATTGCTACAACCTTTTCCAGTT	FF30-6 特異的プライマー
FF30-6 6088-R		CTTCATGATGAGCCATTGGA	

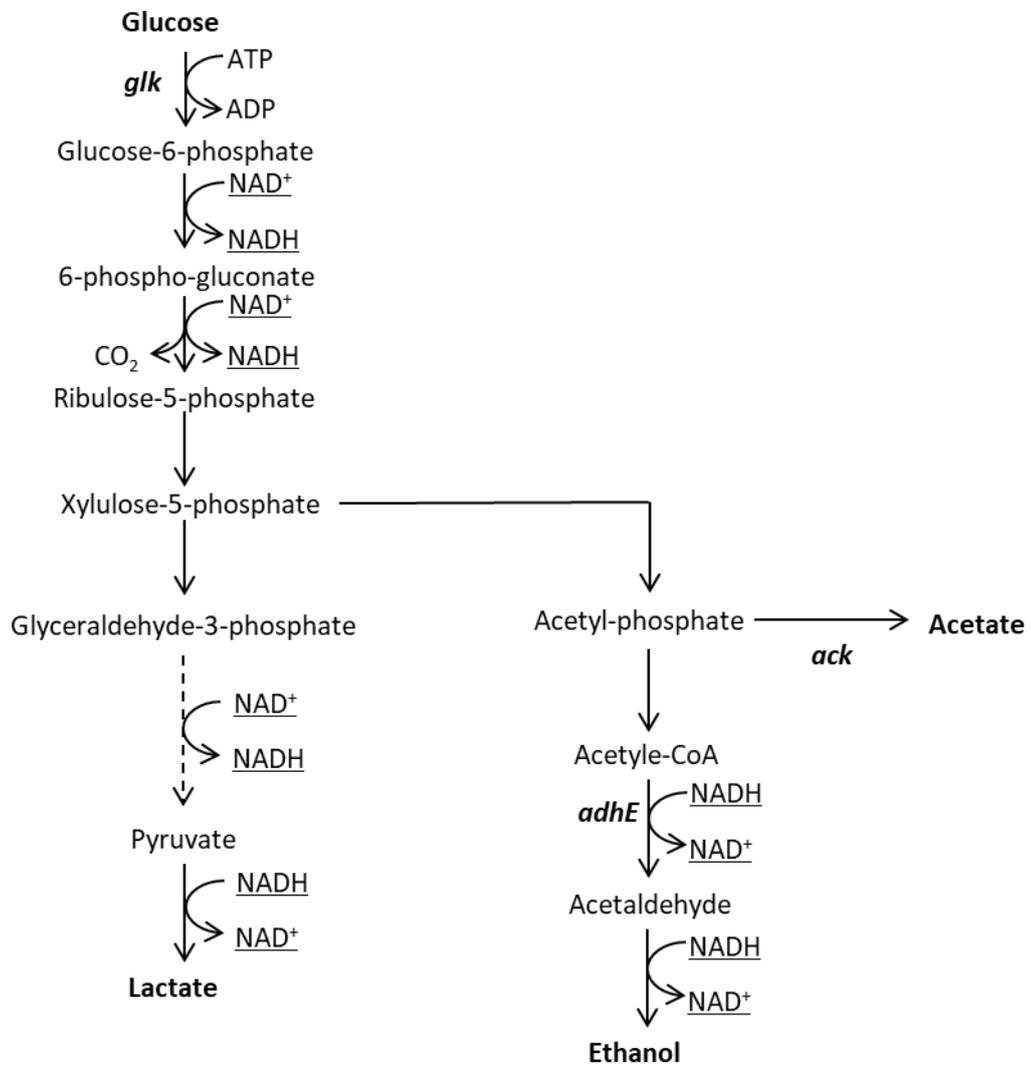


Fig. 10. ヘテロ発酵乳酸菌のホスホケトラーゼ経路

Table 14. PCR の反応液及びPCR プログラム

(a) Taq polymerase を用いた PCR 反応液

10 × Thermopol buffer (NEB)	2.5 μL
2.5mM dNTP (NEB)	2 μL
100 pmol/μL Primer	each 0.1 μL
Taq polymerase (NEB)	0.15 μL
Template DNA	1 μL
dH ₂ O	19.15 μL

(b) *glk, ack, adhE* (partial) の増幅

94 °C 5 min.
↓
94 °C 30 sec.
55 °C 30 sec.
72 °C 45 sec.
(35 Cycle)
↓
72 °C 3 min.
4 °C ∞

(c) 16S rDNA の増幅

94°C 30 sec.
55°C 30 sec.
72°C 90 sec.
(35 Cycle)
↓
72°C 2 min.
4°C ∞

5. *Lactobacillus apinorum* JCM 30765^T 株の生育曲線の作成

-80°C のフリーズストックされている菌体を 1 mL の FYP 培地に接種し、30°C で一晩静置培養を行った。培養液を 8,000 rpm で 5 分間遠心分離し、回収した菌液を 1 mL の 0.85% 生理食塩水で 2 回洗浄した。洗浄後の菌体は 1 mL の 0.85% 生理食塩水で懸濁し、10 倍希釈を 2 回行うことで、100 倍希釈菌液を作成した。5 mL の GYP 培地 2 本、FYP 培地、1% ピルビン酸 Na 添加 GYP 培地に 100 分の 1 量にあたる 50 μL の 100 倍希釈菌液を接種した。GYP 培地のうち 1 本は振とう培養を行った。そのほかの培地条件は全て静置培養を行った。30°C で培養を行い、24 時間ごとに 660 nm における吸光度を測定し、5 日間生育を観察した。測定後の数値はエクセルを用いて生育曲線を作成し、その生育曲線にはエクセルのオプションでスムージングをかけた。

【結果と考察】

ヘテロ発酵乳酸菌のグルコース代謝におけるエタノール生産と代謝中の酸化還元バランスの維持に *adhE* は非常に重要な役割を果たしている (Fig. 3a)。先の研究により、FLAB の代表菌群である *Fructobacillus* 属はこの *adhE* を欠損させていることが報告されており (26)、当該遺伝子の欠損により *Fructobacillus* 属はグルコースを糖源とする培地ではほとんど生育しないというフルクトフィリックな特徴を有していると考えられている。そこで、*L. kunkeei* のフルクトフィリックな特徴にも *adhE* が関与している可能性があるのかを明らかにするために解析を行った。一般的なヘテロ発酵乳酸菌の *adhE* は先に記したように Adh 活性と Aldh 活性の二機能を有する AdhE タンパク質をコードする遺伝子であり、一般的に二機能性のタンパク質である AdhE は N 末端側に Aldh ドメイン、C 末端側に Adh ドメインを有し、850 から 900 アミノ酸残基からなる (78, 79)。今回の解析に用いた *Lactobacillus* 属細菌のうち 4 菌種を除く全ての *Lactobacillus* 属菌種は ADH と ALDH の量ドメインを有する 864 から 898 アミノ酸残基からなる *adhE* を 1 コピーずつ有していた。一方で、16 株の *L. kunkeei* は全て 1,377 bp、458 アミノ酸残基からなり、Adh ドメインを欠損し、Aldh ドメインのみを保持した *adhE* がゲノム上にコードされていた (Fig. 11)。*Lactobacillus ozensis*、*Lactobacillus composti*、*L. apinoruim*、*L. apis* の 4 菌種はほかの *Lactobacillus* 属細菌と異なる結果を示した。*L. composti* と *L. ozensis* はそれぞれ 471 と 874 アミノ酸残基、458 と 877 アミノ酸残基からなる 2 種類の *adhE* を有していることが分かった。このうち小さい方の *adhE* は *L. kunkeei* が有している *adhE* と同様に Adh ドメインはなく、Aldh ドメインのみが保持されていた。*L. ozensis* は *L. kunkeei* と系統的に近く、生息している環境も花やハチ腸管など非常によく似ているため (20, 80, 81)、どちらかからの水平伝播により部分的な

adhE を共有していることも考えられる。*L. composti* と *L. ozensis* の AdhE と *L. kunkeei* の AdhE のアミノ酸レベルでの相同性は 54.3% と 70.2% であった。また、*L. apis* と *L. apinorum* は *adhE* を有してないことが分かった。*L. apis* はホモ発酵乳酸菌であるため、グルコース代謝にホスホケトラーゼ経路を用いず (67)、*adhE* を生育に必要としないことが想定される。このことから、*L. apis* は *adhE* を欠損させたとしても、グルコース代謝において大きな影響を受けないことが考えられた。ヘテロ発酵を行う *Lactobacillus* 属細菌において *adhE* が欠損しているという報告はこれまでにない。

一方で、*L. apinorum* はミツバチから分離された *L. kunkeei* と系統的に近縁なヘテロ発酵乳酸菌である (58)。ヘテロ発酵乳酸菌である一方で、*adhE* を有していないことからフルクトフィリックな特徴を有している可能性が考えられた。そこで、グルコースを糖源とする培地で生育を観察したところ、グルコースを糖源とした培地ではほとんど生育しない一方で、フルクトースが糖源の FYP 培地や電子受容体を添加された GYP 培地では良好な生育を示した (Fig. 12)。また、ゲノム解析の結果糖代謝に関わる class G 遺伝子群をゲノム全体の 3.5% しか有しておらず、PTS を完全に欠損しているという *L. kunkeei* と非常によく似たゲノム構造を有していた。本研究では、これらの表現性状とゲノムの結果から *L. apinorum* は *Lactobacillus* 属に分類される 2 菌種目の FLAB であることを明らかにした。

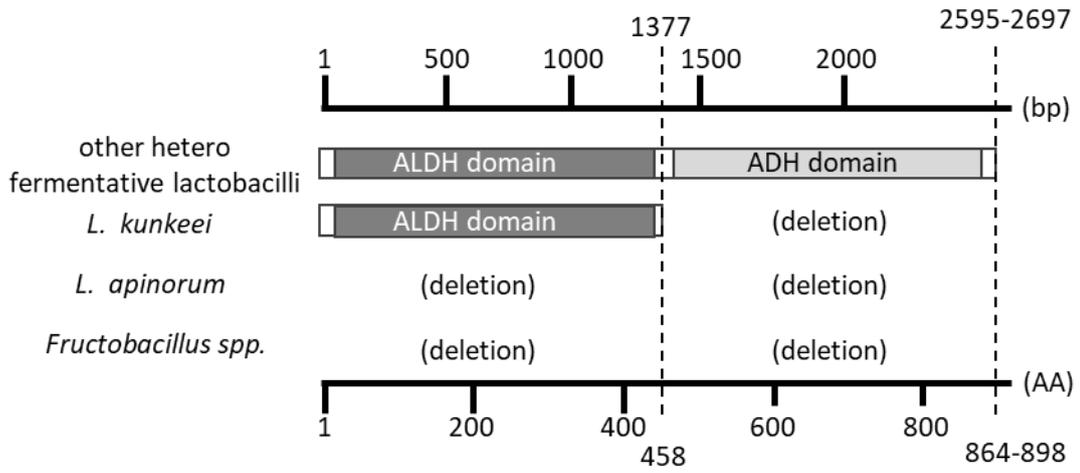


Fig. 11. *L. kunkeei* と other lactobacilli が持つ AdhE タンパクの構造

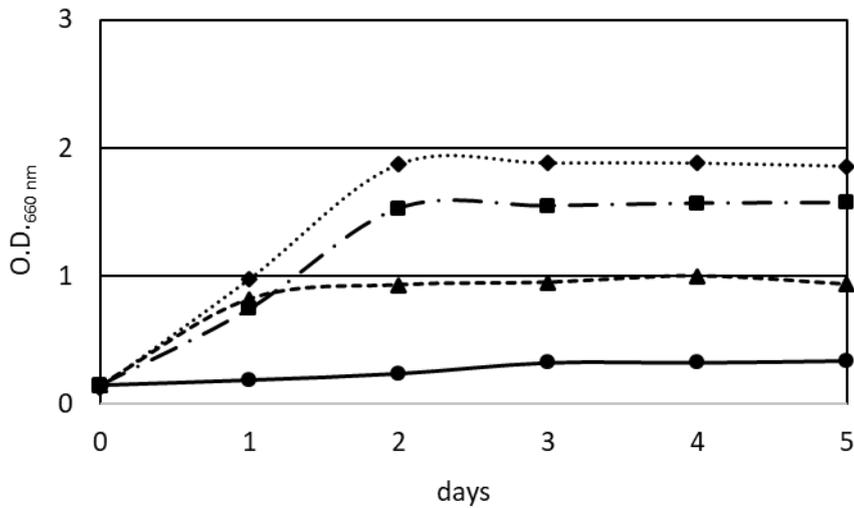


Fig. 12. *Lactobacillus apinorum* JCM 30765^T 株の生育曲線

GYP 培地での生育曲線 (実線●), FYP 培地 (点線▲), 1%ピルビン酸 Na 添加 GYP 培地 (点線■)、また GYP 培地に植菌し振とう培養 (点線◆) で示した。

次に *L. kunkeei* FF30-6 株の部分欠損している *adhE* の遺伝子発現と ADH/ALDH 活性測定を行った。グルコースの代謝は一般的に Fig. 10 のような経路で行われるため、実験のコントロールとして、グルコキナーゼ (*glk*) やアセテートキナーゼ (*ack*) といった遺伝子を用いて発現解析を行ったところ、*L. kunkeei* の部分欠損した *adhE* は *glk* や *ack* と比較して弱いものの (Fig. 11)、発現をしていることが明らかとなった。*ack* はアセチルリン酸からエタノールの代わりに酢酸を生産する役割を持ち、ヘテロ発酵乳酸菌では電子受容体存在下で発現し、代謝に用いられるが、通常のグルコース代謝時は発現しないことが報告されている (82)。また、粗酵素液レベルで Adh、Aldh 活性の測定を行った結果、*L. kunkeei* は Aldh 活性は有しているが、Adh 活性を有していなかった (Table 15)。また、*L. apinorum* 及び *F. fructosus* はコントロールである NADH oxidase の活性は有しているものの、Adh 活性、Aldh 活性は有していなかった (Table 15)。Adh と Aldh の酵素活性の有無は、ゲノム上にコードされている *adhE* を構成するドメインの有無と完全に一致していた (Table 15)。Acetaldehyde は一般的に生物に対して毒性を示すことから、*L. kunkeei* にとっても毒性を示すことが考えられる。*L. kunkeei* は Aldh 活性を有していることから acetaldehyde を生産していることが考えられるが、この acetaldehyde は同一酵素の逆反応によって、acetyl-CoA に変換されている可能性が考えられた。*L. kunkeei* は部分的に *adhE* を有してはいるが、グルコース代謝中の酸化還元バランスの維持には貢献しておらず、その結果グルコースを代謝できないというフルクトフィリックな特徴を有していることが強く示唆された。

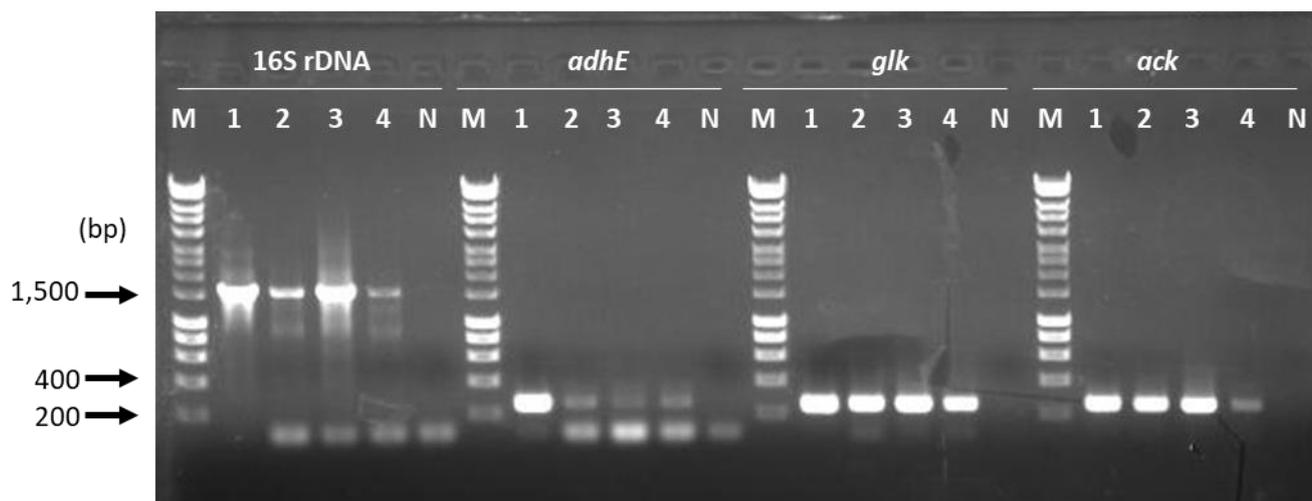


Fig. 13. *L. kunkeei* FF30-6 株の異なる生育期のRT-PCRによる *adhE*, 16S rDNA, *glk* と *ack* の発現
 Lanes M, Hyper ladder 1 kb (Bioline, London, UK); 1, genomic DNA; 2, cDNA from 3-h-old culture;
 3, cDNA from 6-h-old culture; 4, cDNA from 18-h-old culture; N, negative control を示した。

Table 15. Aldh, Adh と NADH oxidase の酵素活性 (mU/mg protein)

	ALDH	ADH	NADH oxidase
<i>L. kunkeei</i> FF30-6	14	0	8,300
<i>L. florum</i> NRIC 0771 ^T	13	570	429
<i>L. apinorum</i> JCM 30765 ^T	0	0	2,982
<i>F. fructosus</i> NRIC 1058 ^T	0	0	343

第 4 節 要約

本章では、多様な生物生態学的特徴を有する *Lactobacillus* 属の中で唯一の FLAB である *L.kunkeei* のゲノムの特徴を明らかにするため、*L.kunkeei* と様々な *Lactobacillus* 属細菌の比較ゲノム解析を行った。その結果、*L.kunkeei* はほかの *Lactobacillus* 属細菌に比べてゲノムサイズを小さくし、糖代謝関連遺伝子を特異的に欠落させていることが明らかになった。特に乳酸菌の主要な糖の取り込み系の一つである Phosphotransferase system (PTS) を完全に欠損していることが明らかとなり、このような特徴は本菌に限られた種類の糖しか代謝をすることができないという生化学的な特徴と一致していた。これらのゲノムの特徴は、先に報告されていた *Fructobacillus* 属のゲノムの構造と類似していた。この結果から、FLAB はフルクトース豊富な環境に適応する過程で、遺伝子を獲得するのではなく、遺伝子を欠損するという退行的進化を行ってきたことが明らかになった。またフルクトース豊富な環境が、系統的に遠縁な乳酸菌に対して非常によく似たゲノムレベルの進化を誘導する可能性があることが強く示唆された。

ここまで、*L.kunkeei* のゲノム全体の特徴を解析したが、フルクトフィリックな特徴を有する直接的な原因に迫っていない。そこで、*L.kunkeei* の *adhE* に着目した解析を行った。一般的なヘテロ発酵乳酸菌のグルコース代謝におけるエタノール生産および酸化還元バランスの維持には、アセトアルデヒド脱水素酵素 (Aldh) 活性及び、アルコール脱水素酵素 (Adh) 活性を有する二機能性タンパク質 AdhE が密接に関わっている。しかし先の研究により、*Fructobacillus* 属細菌は AdhE をコードする遺伝子 *adhE* を欠損していることが明らかにされ、酸化還元バランスを維持することができず、グルコースを代謝することができないと考えられていた。そこで *Lactobacillus* 属細菌の *adhE* に着目したゲノム解析を行った結果、*L.kunkeei* は Adh ドメインを欠損し、Aldh ドメインのみを保持した部分的な *adhE*

を有していた。ヘテロ発酵を行う *Lactobacillus* 属細菌において *adhE* を欠損しているという報告は本研究が世界で初めてである。また、*L. kunkeei* と近縁な *Lactobacillus apinorum* は *Fructobacillus* 属細菌と同じく *adhE* を完全に欠損していた。*L. apinorum* はこれまで FLAB としての特徴が報告されていなかったが、*adhE* を完全に欠損しており、Aldh および Adh 活性を持たず、グルコースをほとんど代謝しないというフルクトフィリックな特徴を有していることが明らかとなった。このことから、*L. apinorum* は *Lactobacillus* 属に分類される 2 菌種目の FLAB であることが明らかになった。

本章にある内容は“Genomic characterization of a bee symbiont fructophilic *Lactobacillus kunkeei* reveals its niche-specific adaptation.” というタイトルで *Systematic and Applied Microbiology* に 2016 年に、“*Lactobacillus apinorum* belongs to the fructophilic lactic acid bacteria.” というタイトルで *Bioscience of Microbiota, Food and Health* に 2017 年に発表した。

第 2 章 *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058^T 株の生育特性における *adhE* 遺伝子の影響

序

Fructobacillus 属はもともと *Leuconostoc* 属に分類されていた *Leuconostoc fructosum*、*Leuconostoc durionis*、*Leuconostoc ficulneus*、*Leuconostoc pseudoficulneus* らが系統的、形態学的、生態学的観点に基づいて再分類され、提唱された乳酸菌属である (18)。現在 *Fructobacillus* 属は、Endo ら (19) により花から分離された *Fructobacillus tropaeoli* を含めた 5 菌種からなる。近年、我々は *Fructobacillus* 属とその近縁乳酸菌である *Leuconostoc* 属の比較ゲノム解析を行った (27)。*Fructobacillus* 属は *Leuconostoc* 属と比べて、糖代謝関連遺伝子を特異的に欠落させ、ゲノム全体を小さくしていることが明らかとなった。また、このフルクトフィリックなゲノムの特徴は *Fructobacillus* 属細菌にとどまらず、同じ FLAB である *Lactobacillus kunkeei*、*Lactobacillus apinorum* も同様のゲノムの特徴を有していた。*Fructobacillus* 属細菌と *L. kunkeei*、*L. apinorum* は系統的に遠縁であるにもかかわらず、非常によく似たゲノムを保存していることを我々は前章で明らかにした。これまでの研究で *Fructobacillus* 属細菌や *L. kunkeei* や *L. apinorum* など FLAB と近縁菌群を比較することでゲノム全体の特徴を明らかにしてきたが、なぜ *Fructobacillus* 属細菌はフルクトフィリックな生育特性を有しているのか、直接的な原因は明らかにされていない。

FLAB はヘテロ発酵乳酸菌に分類され、一般的なヘテロ発酵乳酸菌は乳酸と二酸化炭素、エタノールを生産するが、Fig. 2 で表しているように *Fructobacillus* 属はグルコースを代謝して、乳酸と二酸化炭素、酢酸をほぼ等モルで生産する (18)。一般的なヘテロ発酵乳酸菌のグルコース代謝ではホスホケトラーゼ経路

(Phosphoketolase pathway) の代謝上流で生じた NAD(P)H を代謝下流で酸化し、NAD (P) にすることで、代謝経路全体の NAD(P)/NAD(P)H バランスを保っている (Fig. 3a) 。これには、Alcohol/Acetaldehyde dehydrogenase 活性を持つ二機能性タンパク質 AdhE が密接に関係している。一方で、我々のこれまでの研究により *Fructobacillus* 属は AdhE をコードしている *adhE* 遺伝子を欠損していることが *in silico* 解析やサザンハイブリダイゼーションなどにより明らかにされている (26, 27) 、この *adhE* の欠損によりグルコース代謝が出来ず、代謝を行うために酸素やピルビン酸といった電子受容体を必要とすると考えられている (26) 。

そこで、本章では *Fructobacillus* 属の代表菌種である *F. fructosus* をその近縁種である *Leuconostoc mesenteroides* の *adhE* で形質転換することで、*adhE* の欠損が *F. fructosus* のグルコース代謝に与える影響を観察した。それにより、*Fructobacillus* 属細菌のフルクトフィリックな特徴を有している原因を突き止め、上記仮説について検証することを目的とした。また、FLAB が代謝可能な糖の種類が少ない原因にも *adhE* の欠損が関与しているのか考察した。

第 1 節 大腸菌内での *adhE* のクローニングと作成したプラスミドを用いて *Fructobacillus fructosus* の形質転換

本節ではまず、大腸菌を用いて *Leuconostoc mesenteroides* 由来の *adhE* の遺伝子クローニングを行った。そして、作成したプラスミドを用いて *F. fructosus* に *adhE* を導入させ、目的の形質転換株の作成及びその獲得を目指した。

【実験方法】

1. 使用菌株と実験材料

adhE 遺伝子供与体として *F. fructosus* の近縁種である *Leuc. mesenteroides* NRIC 1541^T 株を用いた。遺伝子導入のためのベクターとして慶尚大学校教授 (韓国) の Jeong Hwan Kim 先生より分与していただいた *Leuc. mesenteroides* 由来であり、*Leuconostoc citreum* での組み替え実績が報告されている pSJE を用いた (83)。pSJE は *Leuconostoc* 属と大腸菌のシャトルベクターであるとして報告されている (84)。プロモーターとして *Lactobacillus brevis* の S-layer protein A をコードする遺伝子である *slpA* の非常に強力なプロモーター領域が組み込まれたプラスミド pLPD4 を東京農業大学農芸化学部准教授 梶川 揚申 先生より分与いただいた (85)。ホストには大腸菌 *E. coli* DH5 α (ニッポンジーン) を用いた (Table 16)。

Table 16. 本研究で使用した(作成された)菌株とプラスミド

菌株名およびプラスミド名	
Strains	
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	ホスト
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRIC 1541 ^T	<i>adhE</i> 供与体
<i>Fructobacillus fructosus</i> NRIC 1058 ^T	親株
<i>Fructobacillus fructosus</i> 1-11	<i>adhE</i> を組み込んだ NRIC 1058 ^T
<i>Fructobacillus fructosus</i> ps1	pSJE (空ベクター)を組み込んだ NRIC 1058 ^T
Plasmids	
pSJE	Erythromycin 耐性の大腸菌- <i>Leuconostoc</i> シヤトルベクター
pLPD4	
pSJE- <i>adhE</i>	pSJE に <i>adhE</i> を組み込んだ
pSJE- <i>adhE</i> pro ^t	pSJE- <i>adhE</i> に terminator が組み込まれた promoter を組み込んだ
pSJE- <i>adhE</i> pro ^t 2	pSJE- <i>adhE</i> pro ^t 2 から NotI サイトを切り取った

2. *adhE* を挿入したプラスミド作成

本研究で用いたプライマーは Table 17 に記載し、プラスミド作成のフローチャートを Fig. 14 として記載した。まず、インサートの調整を行った。Table 17 に示したプライマーで *Leuc. mesenteroides* NRIC 1541^T 株の *adhE* 遺伝子のみを長鎖増幅用ポリメラーゼ PRIME STAR Max (タカラバイオ) を用いた PCR により増幅した。反応液組成は 2×PRIME Star Max: 12.5 μ L; Forward Primer: 0.3 μ L; Reverse Primer: 0.3 μ L; dH₂O (PCR grade): 10.9 μ L; 鋳型 DNA: 1 μ L とし (Table 18a)、氷中で作成した。PCR は、98°C で 1 分間予備的な熱変性を行い、98°C で 20 秒間の熱変性、55°C で 10 秒間のアニーリング、72°C で 30 秒間の伸長反応を 45 サイクル行い、72°C で 3 分間完全に伸長させた後 4°C で保存した (Table 18c)。PCR での増幅産物を電気泳動にて確認後、MilliQ 水で 300 μ L にフィルアップした後、等量のフェノールクロロホルムを加え、13,000×g で 15 分間遠心分離し、上清を丁寧に新しい 1.5 mL チューブに移した。そこに、1/10 量の 5 M Potassium acetate (pH4.8) と 2.5 倍量の無水エタノールを加え、室温で 5 分間放置した。13,000×g、10 分間、4°C で遠心分離を行い、上清を捨てたのち、200 μ L の 70%

エタノールでリンスを行い、同じく遠心分離を行った。上清を丁寧に取り除き、風乾後、精製前の DNA と等量の MilliQ 水で溶解し、精製とした。以下に精製の簡易実験フローを記載する (手順 2)。ベクターは、pSJE が導入されている *E. coli* JM109 株を 200 mL の Brain Heart Infusion (BHI) 培地 (OXOID) で大量培養し、QIAGEN Plasmid Purification Max (QIAGEN) を用いてプラスミド抽出を行った。インサートとベクターのそれぞれを制限酵素 BamHI と PstI で処理した。モル比が 1:1 となるように調整し、2x Ligation Mix (ニッポンジーン) を用いてライゲーションを行った。ライゲーションを行ったプラスミド (pSJE::*adhE*) で、ECOS システム *E. coli* DH5 α 株 (ニッポンジーン) に形質転換を行った。本形質転換には推奨されているヒートショック法の 6 分間プロトコールを用いた。

さらに、pSJE の MCS 上流にプロモーターが存在していない、もしくは機能していないことが考えられたためプロモーターの挿入を行った。プロモーターは *Lactobacillus brevis* が保持している *slpA* (surface layer protein A) 由来のプロモーターを用いた。本プロモーターの途中にはターミネーターが組み込まれており、通常は発現しないが、制限酵素 NotI にて、ターミネーター領域を切り取り、セルフライゲーションさせることによってプロモーターとして機能し、下流の遺伝子を発現させることが出来る (Fig. 15)。プロモーター領域は pLPD4 から制限酵素 BglIII と BamHI で制限酵素処理し切り取り、pSJE::*adhE* の *adhE* 上流を BamHI で処理し開環させ、Alkaline Phosphate (ニッポンジーン) でアルカリホスファターゼ処理を行い、ライゲーションを行った。そのプラスミド (pSJE::*adhE*:::*PslpA'*) により、再び *E. coli* DH5 α を形質転換させた。

ターミネーターで NotI を切り取る際に、プラスミド上にほかの NotI サイトが存在すると、余計な組み換えや目的プラスミド以外の不必要なものが出る可能性があるため、マルチクローニングサイトの下流に存在する NotI サイトの前後にある制限酵素サイト (XbaI 及び SacI) で処理後、DNA Blunting Kit (タカラバ

イオ) を使用して、ブランチング処理を行った後、セルフライゲーションを行い、*E. coli* DH5 α を形質転換した。この形質転換株の確認は、PCR を用いて行いプライマーは *adhE*-NotI-cut(+)/*adhE*-NotI-cut(-) と *adhE*-F2400 を用いた (Table 13)。

手順 2 増幅した PCR 産物の精製

1. DNA 溶液を MilliQ 水 で 300 μ L にフィルアップ。
2. 300 μ L の フェノールクロロホルムを加えた。
3. 13,000 \times g で 15 分間遠心分離。
4. 上清を丁寧に新しい 1.5 mL チューブに移した。
5. 1/10 量の 5 M Potassium acetate (pH4.8) と 2.5 倍量のエタノール (99.6%) を添加。
6. 室温で 5 分間放置。
7. 13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心分離。
8. 上清を捨てたのち、200 μ L の 70% エタノールを加えた。
9. 13,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心分離。
10. 上清を丁寧に取り除き、10 分間風乾。
11. 精製前の DNA と 50 μ L の MilliQ 水で溶解。

Table 17. 本章で用いたプライマーの用途と配列

プライマー名	増幅産物 (bp)	塩基配列 (5'→3')	使用用途
pSJE- <i>adhE</i> -BamHI-F2	2803	AAAGGATCCGTGCACTAATCTAAATATGTG	大腸菌内で <i>adhE</i> のクローニング
pSJE-PstI- <i>adhE</i> -R		GGCCTGCAGCTCTTTTTTAAACTGATC	大腸菌内で <i>adhE</i> のクローニング
<i>adhE</i> -NotI-cut(+)		CGAATTGGAGCTCCACCATT	NotI サイトの除去の確認
<i>adhE</i> -NotI-cut(-)		AATTGGAGCTCCACCGCG	NotI サイトの除去の確認
pSJE for Seq1		GCGGGCCTCTTCGCTATTA	MCS 上流の塩基配列増幅
<i>adhE</i> -F350		CAAGGTAAGGTAGAATTAGC	<i>adhE</i> の検出及び、シーケンス
<i>adhE</i> -R500		ATAAACTGATTCTGAGGCGA	<i>adhE</i> の検出及び、シーケンス
<i>adhE</i> -F1100		TGCATACCTTGTTCTAAGA	<i>adhE</i> の検出及び、シーケンス
<i>adhE</i> -R1250		TAATCGAACAAAAGTACAT	<i>adhE</i> の検出及び、シーケンス
<i>adhE</i> -F1700		CTTACTTACAAGACTTGCCCT	<i>adhE</i> の検出及び、シーケンス
<i>adhE</i> -R1800	AATCGCCTCGTCATCTTCTA	<i>adhE</i> の検出及び、シーケンス	
<i>adhE</i> -F2000	GTTGCTATTGTTGATCCAGA	<i>adhE</i> の検出及び、シーケンス	
<i>adhE</i> -F2440	GCACGCACAAAGATGCACTA	<i>adhE</i> の検出及び、シーケンス	
1058 <i>glk</i> F	213	ACCAAGGTGAGGTCCAACAG	<i>glk</i> の遺伝子発現解析
1058 <i>glk</i> R		TCGCCAACCAAGGTTATAG	<i>glk</i> の遺伝子発現解析
8F	1550	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	16S rRNA の発現解析
15R		AAGGAGGTGATCCAACCGCA	16S rRNA の発現解析

Table 18. PCR の反応液及びPCR プログラム

(a) Taq polymerase を用いた PCR 反応液

10 × Thermopol buffer (NEB)	2.5 μL
2.5mM dNTP (NEB)	2 μL
100 p Primer	each 0.1 μL
Taq polymerase (NEB)	0.15 μL
Template DNA	1 μL
dH ₂ O	19.15 μL

(b) PRIME STAR Max (タカラバイオ) を用いた PCR 反応液

2 × PRIME Star Max	12.5 μL
Primer	each 0.3 μL
Template DNA	1 μL
dH ₂ O	10.9 μL

(c) インサート (*adhE*) の増幅

98 °C 1 min.
↓
98 °C 20 sec.
55 °C 10 sec.
72 °C 30 sec.
(45 Cycle)
↓
72 °C 3 min.
4 °C ∞

(d) *adhE* の全長

94 °C 2 min.
↓
94 °C 30 sec.
55 °C 40 sec.
72 °C 3 min.
(50 Cycle)
↓
72 °C 7 min.
4 °C ∞

(e) *adhE* の部分配列 (500 - 750 bp) 及び、
発現解析

94 °C 5 min.
↓
94 °C 30 sec.
55 °C 30 sec.
72 °C 45 sec.
(35 Cycle)
↓
72 °C 3 min.
4 °C ∞

(f) 16S rDNA の増幅

94 °C 30 sec.
55 °C 30 sec.
72 °C 90 sec.
(35 Cycle)
↓
72 °C 2 min.
4 °C ∞

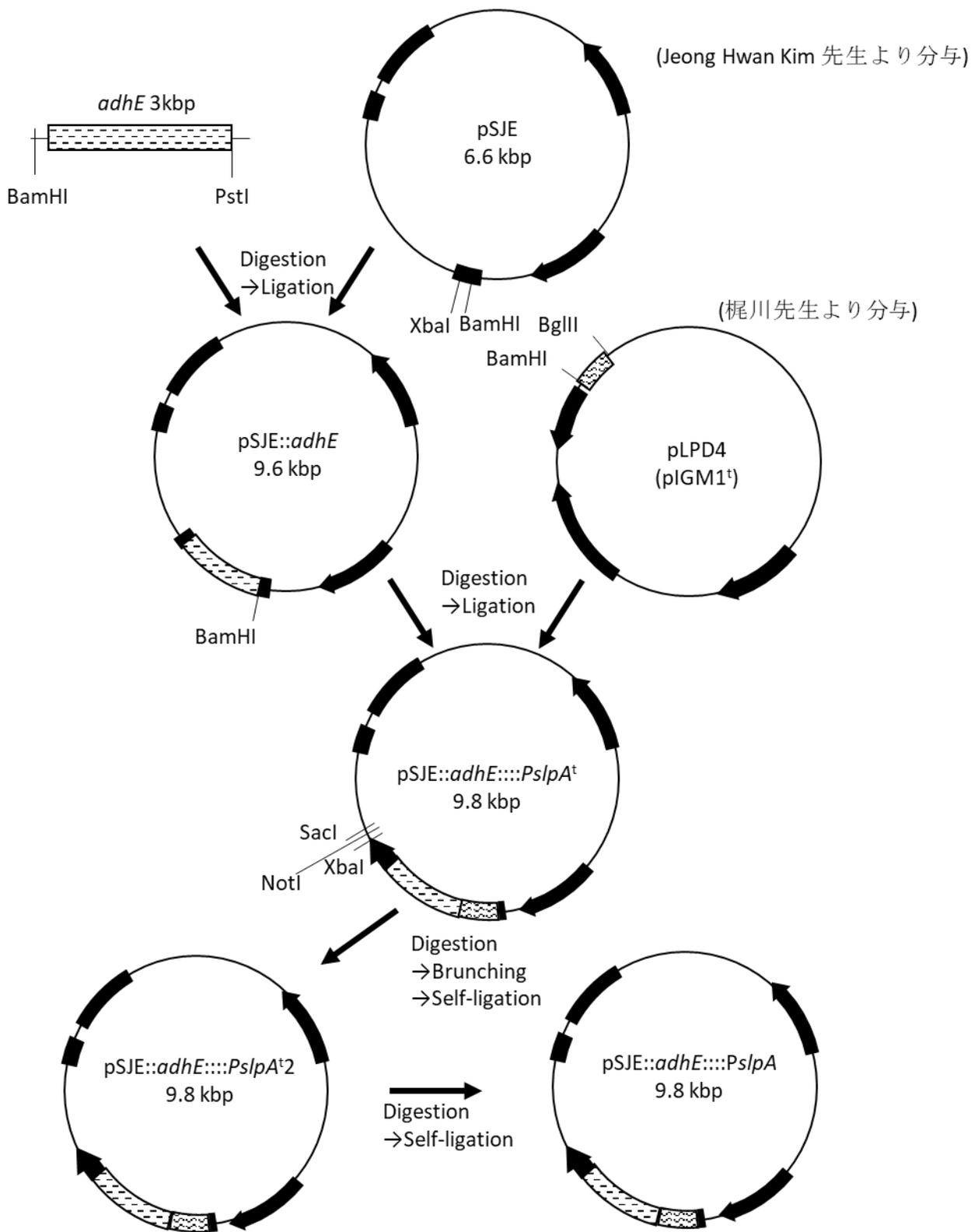


Fig. 14 プラスミド作成のフローチャート

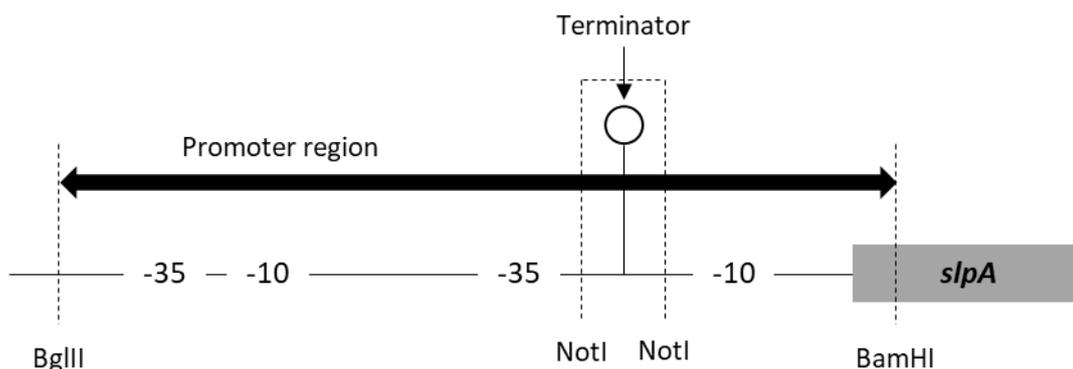


Fig. 15. pLPD4 由来プロモーター領域

3. 大腸菌の形質転換株の確認

adhE が挿入された目的のプラスミドの作成の可否を PCR 及び、プラスミド抽出し、抽出物を制限酵素処理することで確認した。PCR 法で確認する際に使用したプライマーは Table 18 に示した。サンプル数を増やし、試験を効率化させるために PCR の鋳型として大腸菌培養菌液を 1 μ L 用いた。PCR には New England BioLabs Japan 社の Taq Polymerase を用い、反応液は 25 μ L スケールで行った (PCR 反応液 10 \times Thermopol Buffer: 2.5 μ L; dNTP: 2 μ L; Forward Primer: 0.1 μ L; Revers Primer: 0.1 μ L; Taq polymerase: 0.15 μ L; dH₂O (PCR grade): 19.15 μ L) (Table 18a)。およそ 3,000 bp の *adhE* 遺伝子の全長を伸長させるときは、94 $^{\circ}$ C で 2 分間予備的な熱変性を行った後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間の熱変性、55 $^{\circ}$ C で 40 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 3 分間の伸長反応を 50 サイクル行い、72 $^{\circ}$ C で 7 分間完全に伸長させた。完全伸長後は 4 $^{\circ}$ C で保存した (Table 18d)。*adhE* の一部領域 (750 bp より短い配列) を増幅させる際には、94 $^{\circ}$ C で 5 分間予備的な熱変性を行い、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間の熱変性、55 $^{\circ}$ C で 30 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 45 秒間の伸長反応を 35 サイクル行い、72 $^{\circ}$ C で 7 分間完全に伸長させた後 4 $^{\circ}$ C で保存した (Table 18e)。

プラスミド抽出はアルカリ SDS 法を用いて行った。1 mL 培養液から集菌後、

150 μL の Lysis buffer (50 mM グルコース; 25 mM Tris-HCl pH8.0; 10 mM EDTA) で完全に懸濁し、200 μL のアルカリ溶液 (200mM NaOH; 1% SDS) を入れ転倒混和後、氷中で 5 分間静置した。150 μL の 5 M Potassium acetate (pH4.8) を加え、優しく混和した後、氷中で 5 分間静置した。500 μL フェノールクロロホルム (24:25)を加え 13,000 \times g、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離を行い、丁寧に上清を新しいチューブに移した。1.5 倍量の無水エタノールを加え、13,000 \times g、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離を行い、上清を捨てたのち、200 μL の 70% エタノールでリンスを行い、同じく遠心分離を行った。上清を丁寧に取り除き、風乾後、50 μL の TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0); 1 mM EDTA) で溶解し、0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように RNase を加え、30 分間、37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションしたものをプラスミドとした。このプラスミド抽出のプロトコールを以下に簡易フローチャートとして記載する。適当な制限酵素を用いて切断し、1% アガロースゲル電気泳動を行い、目的のプラスミドの保持を確認した。プラスミド抽出の簡易的なフローチャートは手順 3 に記した。

加えて、PCR にて増幅の確認後、ISOSPIN PCR products (ニッポンジーン) で精製した。BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) を用いて配列を決定した。PCR 産物はサイクルシーケンスの反応組成液は 2 μL の 5 \times cycle sequencing buffer, 1 μL の 1.6 pmol/ μL primer, 1 μL の精製 PCR 産物, 1 μL の BigDye Terminator, 5 μL の dH₂O (PCR grade) とし、氷中で調整した。サイクルシーケンスは 96 $^{\circ}\text{C}$ で 10 秒間、50 $^{\circ}\text{C}$ で 5 秒間、60 $^{\circ}\text{C}$ で 4 分間を 25 サイクル繰り返し、終了後は 4 $^{\circ}\text{C}$ で遮光して保存した。その後、精製を行った。10 μL の反応液に 1 μL の 3M NaAc、25 μL の 99% Ethanol (常温) を加え、15 分間室温放置後、15,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清は丁寧に廃棄した。そこに、70% Ethanol (常温) を 100 μL 滴下し、再び 15,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清は丁寧に廃棄した後、5 分間風乾した。これをサンプルとし、DNA シーケンサー Applied

Biosystems PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) に供した。シーケンスのための実験フローは Fig. 16 に示す。

シーケンス結果 “.ab1” ファイルを BioEdit で編集後、“.fast” ファイルとして保存した。それらのシーケンスファイルを必要に応じて、DNAMAN for Windows (version 4.15) を用いてアッセンブリし、NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の BLASTN もしくは、GENETYX ネットワーク版 (version 13.1.1) にて供与体との相同性を確認した。アッセンブルは 20 塩基以上の重なった配列が 90% 以上の相同性を示すときにアッセンブルされるようにパラメーターを調整した。

目的プラスミドの保持を確認した大腸菌を 5 mL の 200 µg/mL Erythromycin 添加 BHI 培地に接種し、37°C で一晩振とう培養を行い、High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) を使用してプラスミド抽出を行い、*F. fructosus* の形質転換に用いた。

手順 3 アルカリ SDS 法による大腸菌からのプラスミド抽出

1. 1 mL の培養液から集菌 (8,000×g, 5 分間)。
2. 150 μ L の GTE buffer (50 mM グルコース; 25 mM Tris-HCl pH8.0; 10 mM EDTA) で懸濁。
3. 200 μ L の アルカリ溶液 (200mM NaOH; 1% SDS) を入れ転倒混和。
4. 氷中で 5 分間静置した。
5. 150 μ L の 5 M Potassium acetate (pH4.8) を加え、優しく転倒混和。
6. 氷中で 5 分間静置した。
7. 500 μ L のフェノールクロロホルム (24:25) を加えた。
8. 13,000×g、15 分間、4° C で遠心分離。
9. 丁寧に上清を新しいチューブに移した。
10. 1.5 倍量のエタノール (99.6%) を加え、室温で 5 分放置。
11. 13,000×g、15 分間、4° C で遠心分離。
12. 上清を捨てたのち、200 μ L の 70% エタノール加えた。
13. 13,000×g、15 分間、4° C 同じく遠心分離。
14. 上清を丁寧に取り除き、10 分間風乾。
15. 50 μ L の TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0); 1 mM EDTA) で溶解。
16. RNase 処理をした。

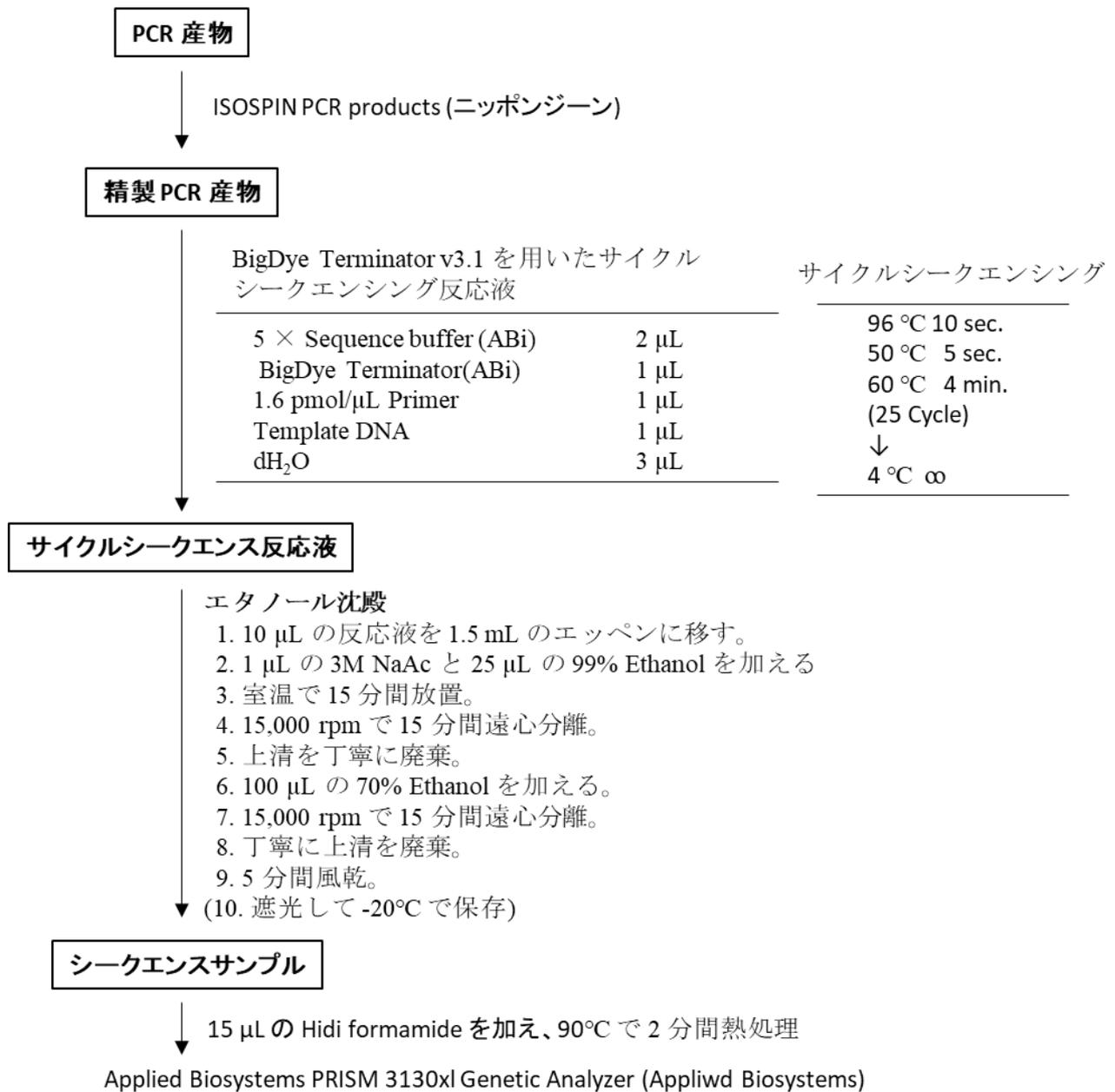


Fig. 16. シーケンスの実験フローチャート

4. *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058^T 株の形質転換

まず、Q. Jin et al. (86) が行った *Leuc. mesenteroides* の形質転換法をもとに、*F. fructosus* NRIC 1058^T 株のコンピテントセルを作成した。-80°C に保存してある菌体を 5 mL の GYP 培地 (グルコース: 1%; Yeast extract: 1%; Polypeptone: 0.5%; Sodium acetate: 0.2%; 50 mg/mL Tween 80: 1%; Salt solution: 0.5%) にて、30°C で 24 時間振とう培養 (120 rpm) を行った。その培養液を 200 mL の 0.25 M Sucrose、1.5% glycine 添加 MRS 培地に移した。菌体濁度 OD (660 nm) が 0.2 に至ったところで、培養液中で 0.125 µg/mL となるように penicillin G を添加した。さらに OD が 0.6 に達するまで 30°C でインキュベーションし、菌体を無菌低温環境下で回収した。回収した菌体を培養液と等量の MilliQ 水で洗浄し、5 mL の 40 µg/ml Lysozyme 添加 EPS (1 mM K₂HPO₄; 1 mM KH₂PO₄; 0.5 mM Sucrose; 1 mM MgCl₂, pH 7.4) で懸濁し、37°C で 30 分間インキュベーションを行った。その後、5 mL の EPS で 2 回洗浄を行い、200 µL の EPS で懸濁し、50 µL ずつ分注したものをコンピテントセルとした。液体窒素で急速凍結し、-80°C で保存した。コンピテントセルの作成方法の簡易的なフローは手順 4 に示した。

次にエレクトロポレーションを行った。2 mm 氷冷キュベットにコンピテントセルを入れ、DNA を 5 µg 以下となるように入れた。その後、電極にセットし、1.5 kV、25 µF、200 Ω のパルスを 5 秒間流した。回復培養として、30°C の 1 mL の 0.5M Sucrose、0.1 M の MgCl₂、1% Sodium pyruvate 添加 MRS を優しくキュベットに注ぎ、3 時間回復培養を行った。5 µg/mL Erythromycin 添加 MRS 寒天培地に平板塗抹し、コロニーが出てくるまでのおよそ 3 日間 30°C で培養を行った。

手順 4 乳酸菌コンピテントセルの作成

1. 5 mL の GYP 培地で 30°C で 24 時間振とう培養 (120 rpm)。
 2. 培養液を 200 mL の 0.25 M Sucrose、1.5% glycine 添加 MRS 培地に移した。
 3. OD (660 nm) が 0.2 で、0.125 µg/mL となるように penicillin G を添加。
 4. OD が 0.6 に達したら、4°C で 8,000 rpm、15 分間遠心分離。
 5. 等量の MilliQ 水で洗浄。
 6. 5 mL の 40 µg/ml Lysozyme 添加 EPS (1 mM K₂HPO₄; 1 mM KH₂PO₄; 0.5 mM Sucrose; 1 mM MgCl₂, pH 7.4) で懸濁。
 7. 37°C で 30 分間インキュベーション。
 8. 5 mL の EPS で 2 回洗浄。
 9. 200 µL の EPS で懸濁。
- ※50 µL ずつ分注したものをコンピテントセルとした。
10. 2 mm 氷冷キュベットにコンピテントセルを装填。
 11. DNA を 5 µg 以下入れた。
 12. 電極にセット
 13. 1.5 kV、25 µF、200 Ω のパルス を 5 秒間流す。
 14. 30°C の 1 mL の 0.5M Sucrose、0.1 M の MgCl₂、1 % Sodium pyruvate 添加 MRS で 3 時間の回復培養。
 15. 5 µg/mL Erythromycin 添加 MRS 寒天培地に平板塗抹。

6. *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058^T 株の形質転換株の確認

PCR による確認では鋳型に、洗浄した菌体を菌液と等量の TE buffer で懸濁し、0.1 g のガラスビーズで破碎したサンプルを簡易抽出 DNA 溶液として用い、反応液の組成は大腸菌の形質転換株の確認を行ったときと同様にした (本章本節項目 3)。プライマーは Table 17 に示したように、それぞれのターゲットとする遺伝子に合わせて選択した。

目的の形質転換株の作成の可否の確認は、プラスミド抽出及び、PCR を用いて行った。プラスミド抽出は乳酸菌用のミニプレップにて行った。1 mL の培養菌液から菌体を集菌後、200 µL の Extraction buffer (20% Sucrose; 10mM Tris-HCl (pH 8.0); 10 mM EDTA; 50 mM NaCl; 200U/mL Mutanolysin (SIGMA); 40 µg/mL Lysozyme (Wako, Jap.) で懸濁し、37°C で 2 時間インキュベーションを行った。その後、400

μL アルカリ溶液 (200mM NaOH; 1% SDS) を入れ、優しく混和後、300 μL 5 M Potassium acetate (pH4.8) を加え、優しく混和した。13,000 $\times\text{g}$ 、10 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離を行い、沈殿を取り除き、等量の Phenol-chloroform (24:25) を加え、13,000 $\times\text{g}$ 、3 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離し、丁寧に上清を新しいチューブに移した。さらに、等量のイソプロパノールを加え、同様に遠心分離を行った。上清を新しいチューブに移し、1.5 倍量の無水エタノールを加え、13,000 $\times\text{g}$ 、15 分間、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離を行い、上清を捨てたのち、200 μL の 70% エタノールでリンスを行い、同じく遠心分離を行った。上清を丁寧に取り除き、風乾後、TE buffer (10 mM Tris-HCL pH8.0; 1 mM EDTA) で溶解し、0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように RNase を加え、30 分間、37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションしたものをプラスミドとした。以下に簡易的なプロトコールを示す。適当な制限酵素を用いて切断し、1% アガロースゲル電気泳動を行い、目的のプラスミドの保持を確認した。大腸菌と同様に最終確認はサイクラーシーケンシング法を用いて塩基配列を確認した。

手順 5. 乳酸菌からのプラスミド抽出

1. 1 mL の 培養液を 8,000×g で 5 分間遠心分離し、菌体回収。
2. 200 μL の Extraction buffer (20% Sucrose; 10mM Tris-HCl (pH 8.0); 10 mM EDTA; 50 mM NaCl; 200 U/mL Mutanolysin (SIGMA); 40 μg/mL Lysozyme (Wako, Jap.) で懸濁。
3. 37° C で 2 時間インキュベーション。
4. 400 μL のアルカリ溶液 (200mM NaOH; 1% SDS) を入れ、優しく転倒混和。
5. 300 μL の 5 M Potassium acetate (pH4.8) を加え、優しく転倒混和。
6. 13,000 ×g 、 10 分間、4° C で遠心分離。
7. 沈殿を取り除き、等量の Phenol-chloroform (24:25) を加えた。
8. 13,000 ×g 、 3 分間、4° C で遠心分離し、丁寧に上清を新しいチューブに移した。
9. 等量のイソプロパノールを加えた。
10. 13,000 ×g 、 3 分間、4° C で遠心分離。
11. 1.5 倍量のエタノール (99.6%) を加えた。
12. 13,000 ×g 、 15 分間、4° C で遠心分離。
13. 上清を捨てたのち、200 μL の 70% エタノール加えた。
12. 13,000×g、15 分間、4° C で遠心分離。
13. 上清を丁寧に取り除き、10 分間風乾。
14. 50 μL の TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0); 1 mM EDTA) で溶解。
15. RNase 処理をした。

7. RNA の抽出とその逆転写により得られた cDNA を用いた遺伝子の発現解析

F. fructosus NRIC 1058^T は GYP 培地で振とう培養を行い、形質転換株 1-11 株は 200 μg/mL Erythromycin 添加 GYP 培地でそれぞれ 30°C で一晩静置培養を行った。各培養液を GYP 培地に 1/50 量を接種し、18 時間後に RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN) を用いて、RNA を固定させたのち、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA 抽出を行った。抽出した RNA を ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて逆転写を行い、PCR で発現を観察した。また、遺伝子発現のコントロールとして Glucokinase (*glk*)、Acetate kinase (*ack*)、16S rRNA の遺伝子も解析を行った (Fig. 10)。逆転写後、PCR により発現を解析した。プログラムは Table 18 に示す。

【結果と考察】

本研究では上記 Table 16 に示した菌株及びプラスミドを得ることができた。まず、ベクター由来の MCS 上流にあるとされるプロモーターを利用した実験系を構築した。*Leuc. mesenteroides* の *adhE* とその SD 配列を PCR により増幅し、PCR 産物と pSJE を制限酵素 BamHI と PstI で処理し、断片末端を調整した後、ベクターとインサートのモル比を 1:1 となるように調整した。それらをライゲーションし、*E. coli* DH5 α の形質転換を行った。プレートに塗抹してから約 2 日後に 0.1 mm から 1 mm のコロニーの形成を観察できたので、プラスミド抽出を行い、制限酵素処理をした。それに加え、PCR により *adhE* の有無を確認したところ、5.6% (7/126) の確率で目的形質転換株の獲得に成功した。これら形質転換株から 2 株をランダムに選抜し、サイクルシーケンシング法により、これらの形質転換株が有している *adhE* と供与体である *Leuc. mesenteroides* NRIC 1541^T 株の *adhE* との相同性を確認したところ 100% の相同性を確認することが出来た。本操作は同じく ECOS システムの *E. coli* JM109 株を用いても行ったが、こちらでは目的の形質転換体を得ることができなかった。

次に、このプラスミド (pSJE::*adhE*) を用いて *F. fructosus* NRIC 1058^T 株の形質転換を行ったところ、 2.1×10^2 CFU/ μ gDNA の形質転換効率で、プレートに平板塗抹を行ってから 4 日目におよそ 1 mm のコロニーが現れたことを確認した。そのプレートからランダムにコロニーをピックアップし、*adhE* を有していることを PCR 及びプラスミド抽出により確認した (Fig. 17)。そこで、その形質転換株と親株のグルコースを糖源とする培地上での生育を比較した。ところが、親株と形質転換株のグルコースを糖源とする培地上での生育度はほとんど変化がなかったため、*adhE* の発現解析を行った。その結果、形質転換株における *adhE* は全く発現していないことが分かった (Fig. 18)。pSJE を用いたクローニングは過去に 1 例しか報告がないが (83)、この報告では、プロモーターと共に遺伝子を導入して

いることから、pSJE の MCS 上流のプロモーターがないか、うまく機能していないことが考えられた。

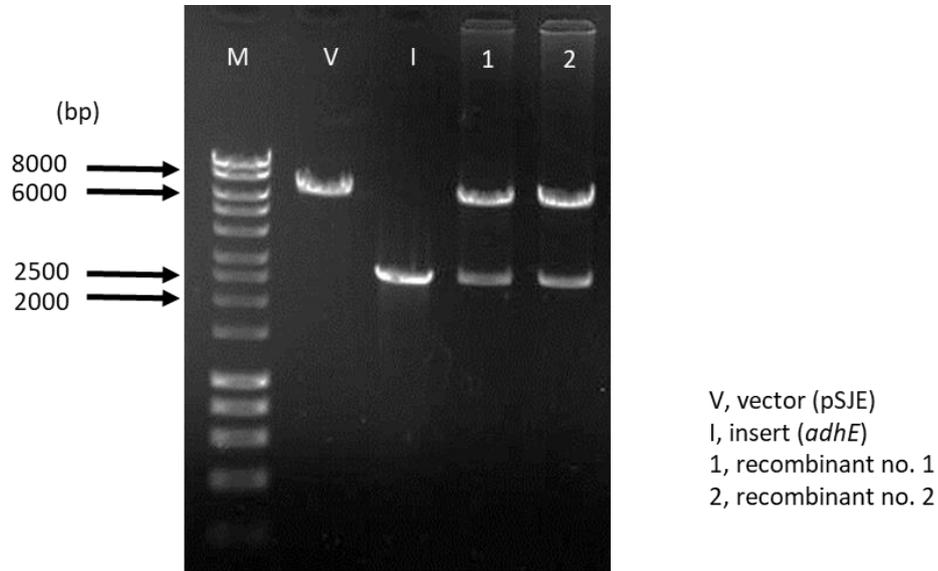
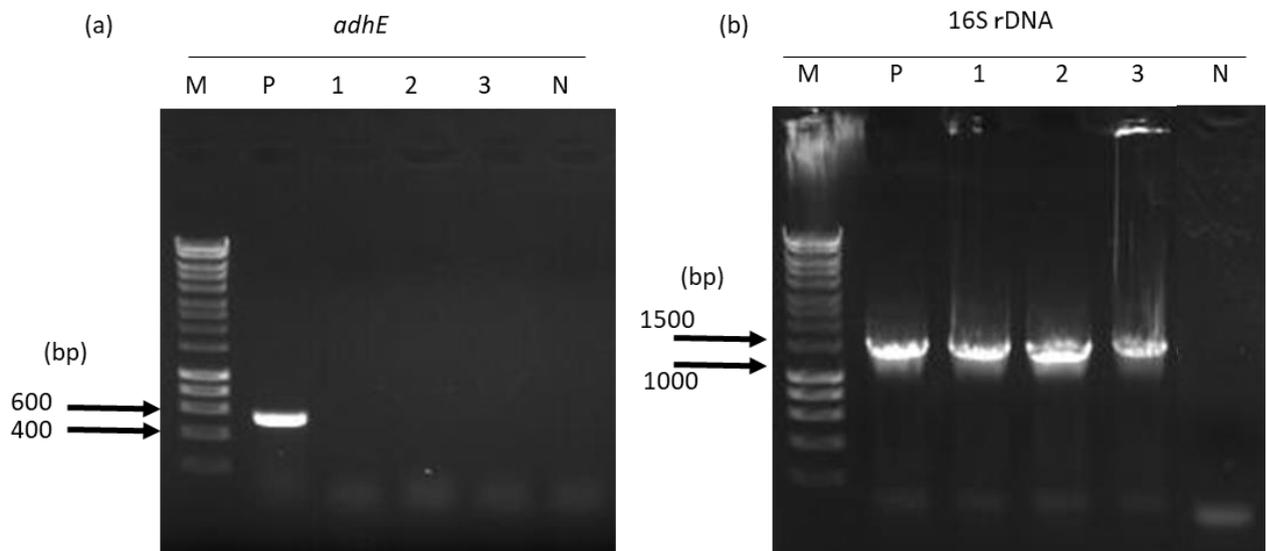


Fig. 17. pSJE::*adhE* の確認

pSJE::*adhE* で形質転換した *F. fructosus* からプラスミド抽出を行い、制限酵素 PstI と BamHI で処理し、電気泳動した。
マーカーは HyperLadder™ 1 kb (BIOLINE) を用いた。



P, Positive control (Genome DNA of *Leuc. mesenteroides* NRIC 1541^T)
1, cDNA parental strain culture
2, cDNA from 6-h-old recombinant no. 1 culture
3, cDNA from 6-h-old recombinant no. 2 culture
N, Negative control

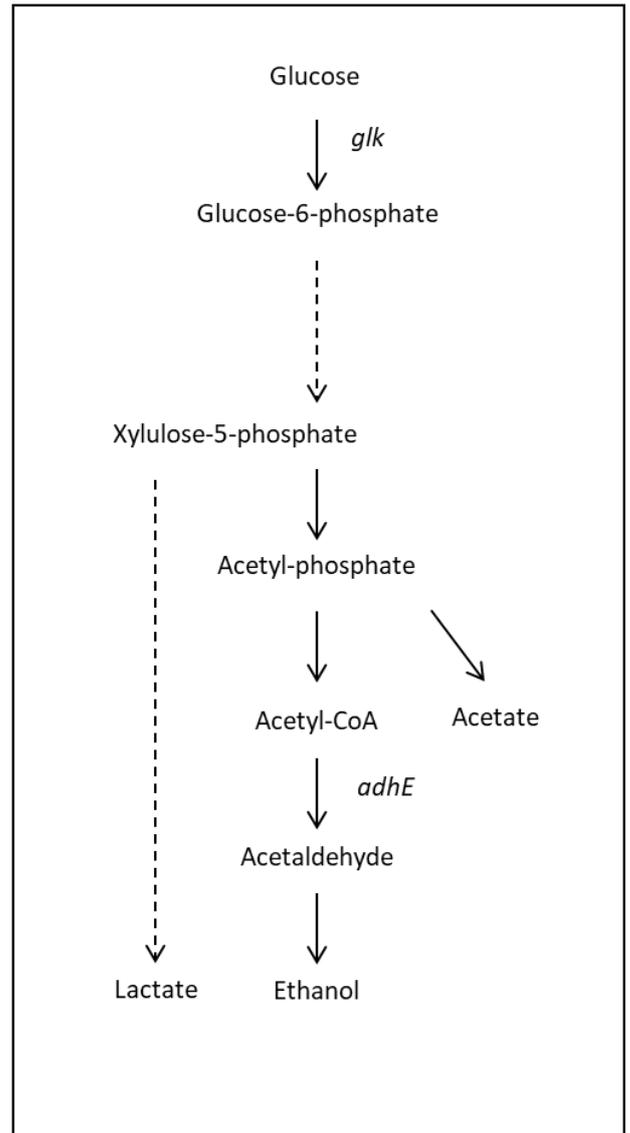
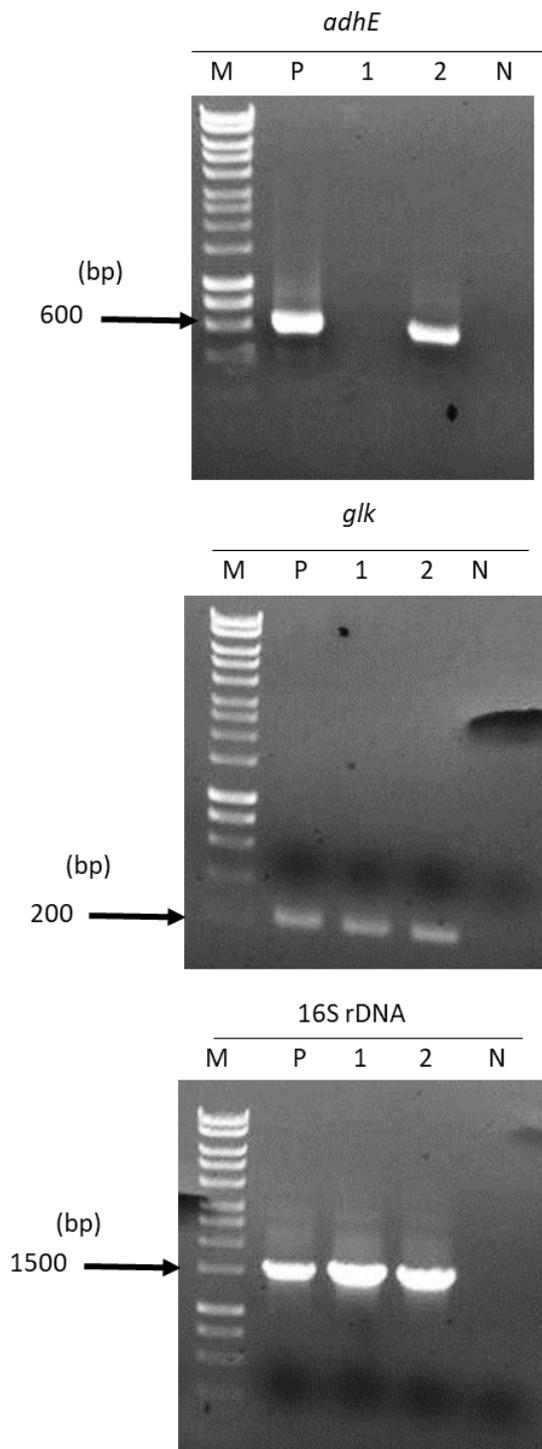
Fig. 18. *Fructobacillus fructosus* に導入した pSJE::*adhE* の *adhE* の遺伝子発現

そこで *Leuc. mesenteroides* の *adhE* とそのプロモーター、ターミネーターを含む塩基配列を PCR により増幅し、同様に pSJE とライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。しかし、目的の形質転換株の獲得には至らなかった。目的プラスミドの作成のために、ベクターとインサートのモル比を 1:1 のほかに 1:0.5–20 を試験したが、いずれも目的の形質転換株の獲得には至らなかった。また、ホストを DH5 α のほかに JM109 や BL21 を用いたり、ベクターを pMG36e や pGKV210 を用いたり、使用する制限酵素を変更したりなど形質転換条件を変更しながら検討重ねたが、目的の形質転換株を得るには至らなかった。*adhE* は大腸菌に対して、毒性を示すと報告がなされており (87)、そのため形質転換株が得られないと考えた。

そこで、大腸菌内では *adhE* を発現させず、乳酸菌内で発現させるプラスミドの構築を行った。そのために、東京農業大学応用生物科学部農芸化学科准教授 梶川 揚申 先生にプラスミド pLPD4 を分与していただいた。先に作成した pSJE::*adhE* の *adhE* 上流に、プラスミド pLPD4 上にある *L. brevis* の *slpA* 由来の -35 ボックスと -10 ボックスを 2 個ずつ有している非常に強力なプロモーター (*PslpA*^l) を挿入した (85)。そのプロモーター配列の途中には制限酵素 NotI (GCGGCCGC を認識) で切断できるターミネーターが組み込まれている。この領域は NotI サイトも GC 含量が非常に多く、ターミネーター領域の GC 含量が非常に高い強力なターミネーターとなっている。まず、pSJE::*adhE* を BamHI で処理し、pLPD4 から *PslpA*^l の領域を BamHI と BglIII で切り出し、モル比が 1:10 となるようにライゲーションを行った。BamHI と BglIII の処理によりできた凹凸末端はそれぞれ相補的な関係にあり、セルフライゲーションを行うことが出来る。セルフライゲーションしてできたプラスミド (pSJE::*adhE*:::*PslpA*^l) で *E. coli* DH5 α 株を形質転換し、目的の形質転換株を同様に確認したところ、45.8% (11/24) の確率で目的の形質転換株の獲得に成功した。再び、サイクルシーケンシング法

によりシーケンスを行い、ターミネーター領域以外の塩基配列は確認できた。ターミネーター領域は GC 含量が高すぎたため読むことが出来なかったと考えられる。作成した pSJE::adhE:::PslpA² を大腸菌から抽出し、NotI にてターミネーターを切り取り、セルフライゲーション後、*F. fructosus* NRIC 1058^T 株を形質転換した。最高で 4.5×10^1 CFU/ μ gDNA の形質転換効率で、コロニーが出現するまでにプレートに平板塗抹を行ってから、約 5-6 日を要した。これらのコロニーに対して *F. fructosus* が *adhE* を有しているのか PCR により確認を行った。しかし、プロモーターのみならず、なぜか *adhE* を欠落させており、*adhE* を保持している目的の *F. fructosus* 形質転換株を得ることはできなかった。*F. fructosus* に対しても、大腸菌と同様に *adhE* の過剰な発現は毒性を示すことが考えられた。

そこで、梶川先生に相談をさせていただいたところ、プロモーター配列途中のターミネーター領域を除かなくても、プロモーター下流の遺伝子が発現している可能性があるという情報をいただいた。そこで、ターミネーターを切り出さずに *F. fructosus* に pSJE::adhE:::PslpA² をエレクトロポレーションにより導入し、形質転換を行った。その結果 5.4×10^1 CFU/ μ gDNA の形質転換効率で、形質転換後、3 日でおおよそ 0.5-1 mm までのコロニーを確認することが出来たので、同様に PCR とプラスミド抽出による確認を行ったところ、目的のプラスミドを有している形質転換株 (1-11) の作成と獲得に成功した。また、NRIC 1058^T 株に pSJE を形質転換した ps1 株を比較対象として作成した。シーケンスにより *Leuc. mesenteroides* の *adhE* と 100% の相同性を示していた。親株 (NRIC 1058^T 株)、ps1 株及び、1-11 株から RNA 抽出を行い、逆転写して PCR を行ったところ、3 株とも *glk* と 16S rRNA 遺伝子の遺伝子発現をしていた。一方で、親株と ps1 株には *adhE* の発現が見られなかったものの、1-11 株は *adhE* を発現していた (Fig. 19)。今回、ターミネーター領域を残したことによって *adhE* の発現量が調節されたことで、目的の形質転換株の獲得に成功したと考えられた。



P, Positive control
 1, cDNA in parental strain
 2, cDNA in recombinant
 N, Negative control

Fig. 19. *F. fructosus* に導入した $pSJE::adhE:::PslpA^t$ の *adhE* の遺伝子発現

$pSJE::adhE:::PslpA^t$ で形質転換した *F. fructosus* から RNA を抽出し、逆転写した cDNA を用いてそれぞれの遺伝子を PCR にて増幅し、電気泳動した。マーカーは HyperLadder™ 1 kb (BIOLINE) を用いた。

第 2 節 *adhE* が *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058^T 株の生育特性に及ぼす影響

前節で獲得した形質転換株 *F. fructosus* 1-11 株および ps1 株のグルコースを糖源とする培地上での生育、またその時の代謝産物、Adh/Aldh 活性測定、API 50 を用いた糖代謝試験を行い、一般的なヘテロ発酵乳酸菌である *Leuc. mesenteroides* NRIC 1541^T 株と親株である *F. fructosus* NRIC 1058^T 株と比較した。それらの結果より *adhE* の欠損が *F. fructosus* の生育特性に与える影響を解析した。

【実験方法】

1. 酵素活性試験のための形質転換株からの粗酵素液の調整と Adh/Aldh 活性の測定

F. fructosus NRIC 1058^T 株、ps1 株は 5 mL の GYP 培地に -80°C の保存サンプルから接種し、30°C で一晩振とう培養 (120 rpm) を行った後、200 mL の GYP 培地に移し、もう一晩静置培養を行った。その培養液にさらに、700 mL の GYP 培地を加え、一晩静置培養を行った。コントロールである *Leuc. mesenteroides* NRIC 1541^T 株及び 1-11 株は 5 mL の GYP 培地に -80°C から接種し、30°C で一晩静置培養を行った後、200 mL の GYP 培地に移し、もう一晩静置培養を行った。第 1 章第 3 節項目 2、3 と同様に回収及び調整と酵素活性の測定を行った。

2. グルコースを生育基質とした時の親株と形質転換株の生育度の比較

第 1 章 3 節項目 5 と同様に生育曲線を作成した。また、グルコースを炭素源とする GYP 寒天培地上に画線塗抹を行い、48 時間嫌気培養をした後、コロニーの形状を観察した。

3. グルコース代謝時の最終代謝産物

-80°C の保存サンプルから NRIC 1058^T 株、ps1 株は 1 mL の FYP 培地に接種し、1-11 株は 1 mL の GYP 培地に接種し、30°C で一晩静置培養を行った。培養された菌液から菌体を遠心分離で回収し、0.85% 生理食塩水で 2 回洗浄を行った。菌液を 0.85% 生理食塩水で 100 倍希釈した後、酢酸ナトリウムを含まない GYP 培地 (グルコース: 1%; Yeast extract: 1%; Polypeptone: 0.5%; 50 mg/ml Tween 80: 1%; Salt solution: 0.5%) に 50 分の 1 量を接種した。培養上清を 24 時間、48 時間で回収し、培養液を -20°C で保存した。J.K. インターナショナル社の F キットを用い、酵素法にて乳酸、酢酸、エタノール量を測定し、それぞれのモル比と対糖収率を求めた。サンプルは必要に応じて培養上清の原液もしくは、100 倍希釈液を用いた (Table 16)。対糖収率は以下の数式を用いて計算した。

(対糖収率) =

$$\frac{\text{エタノール量 (mM)} \times 2 + \text{培養液中の酢酸量 (mM)} \times 2 + \text{培養液中の乳酸量 (mM)} \times 3}{\text{消費グルコース量 (mM)}} \times 100$$

Table 19. 代謝産物試験のための希釈倍率

	NRIC 1058 ^T	1-11	ps1	NRIC 1541
Glucose	100 倍希釈液	原液	100 倍希釈液	原液
Lactate	100 倍希釈液	100 倍希釈液	100 倍希釈液	100 倍希釈液
Ethanol	原液	100 倍希釈液	原液	100 倍希釈液
Acetate	100 倍希釈液	原液	100 倍希釈液	原液

4. API50 を用いた糖代謝試験

Fructobacillus fructosus NRIC 1058^T 株は FYP 培地で、1-11 株は 200 µg/mL Erythromycin 添加 GYP 培地でそれぞれ 30°C で一晩静置培養を行った。その培養液を 0.85% 生理食塩水で 2 回洗浄し、100 µL の菌液を CHL 培地 (BIOMÉRIUX) に入れ、こぼさないように注意して、良く混和した。その菌液を API50 CH プレートのスリットに滴下し、30°C で 7 日間培養を行い、49 種類の糖の発酵能を 24 時間ごとに評価した。CHL 培地にはブロモクレゾールパープルが加えられており、試験管がそれぞれのスリットに入った基質を代謝し、酸を生産することで培地の色が青色から緑色を経て、pH が 5.2 以下へと下がると黄色に変化する。完全な黄色であると判断した場合 + とし、少しでも緑がかっていると判断した場合には w (weak) とした。

5. ゲノム解析による糖代謝経路予測

Fructobacillus fructosus NRIC 1058^T 株のゲノムデータ (Accession number: BBXR01000000) から、これまでに明らかにされている乳酸菌をはじめとする細菌の糖の代謝経路を基に *Fructobacillus fructosus* NRIC 1058^T の糖代謝系の予測を行った (88-92)。

【結果と考察】

前節で *adhE* の発現が確認されたので、まず Adh と Aldh の活性測定を行った。親株と ps1 株は *adhE* を有していないので Adh、Aldh 活性は見られなかったが、1-11 株は 952 mU/mg protein の Adh 活性が観察され、4 mU/mg protein の Aldh 活性を確認できた (Table 17)。これは、一般的なヘテロ発酵乳酸菌である *Leuc. mesenteroides* NRIC 1541^T 株の Adh、Aldh 活性 (136 mU/mg protein、5 mU/mg

protein) と同様に、1-11 株は Adh、Aldh 活性を有していることを示した (Table 20)。いずれの菌株も NADH oxidase 活性を測定したところ、活性を有していたことから、親株及び ps1 株の酵素液には問題がないことを確認した。1-11 株の AdhE は Adh/Aldh 活性を有していることを確認したので、次にグルコースを糖源とする GYP 培地で静置培養を行った。そして親株、ps1 株と 1-11 株の経時的な生育度を測定し、生育曲線を作成した。親株及び、ps1 株は 5 日間の培養でも OD が 0.5 程度であったのに対し (Fig. 20a 実線○、点線)、1-11 株は 3 日目ですでに 1.3 程度にまで達した (Fig. 20a 実線■)。また、GYP 寒天培地上で生育させた 3 株のコロニーを観察した。親株及び、ps1 株は 0.1 mm 以下のごく小さなコロニーしか形成しないのに対し (Fig. 20b)、1-11 株は 0.5-1 mm の一般的な乳酸菌が形成するコロニー程度の大きさとなった (Fig. 20b)。このことから、*F. fructosus* は *adhE* を導入することによってフルクトフィリックな特徴を失い、一般的なヘテロ発酵乳酸菌と同様にグルコースを代謝し、良好な生育を見せた。このことから、*Fructobacillus* 属のフルクトフィリックな特徴は *adhE* 遺伝子の欠損によるものであることが明らかとなった。

Table 20. 親株、形質転換体が持つAdh、Aldhの活性 (U/mg protein)

Strain	Adh	Aldh	NADH oxidase
<i>F. fructosus</i> NRIC 1058 ^T	0	0	5,300
<i>F. fructosus</i> 1-11	952	4	3,900
<i>F. fructosus</i> ps1	0	0	4,600
<i>Leuc. mesenteroides</i> NRIC 1541 ^T	136	5	32

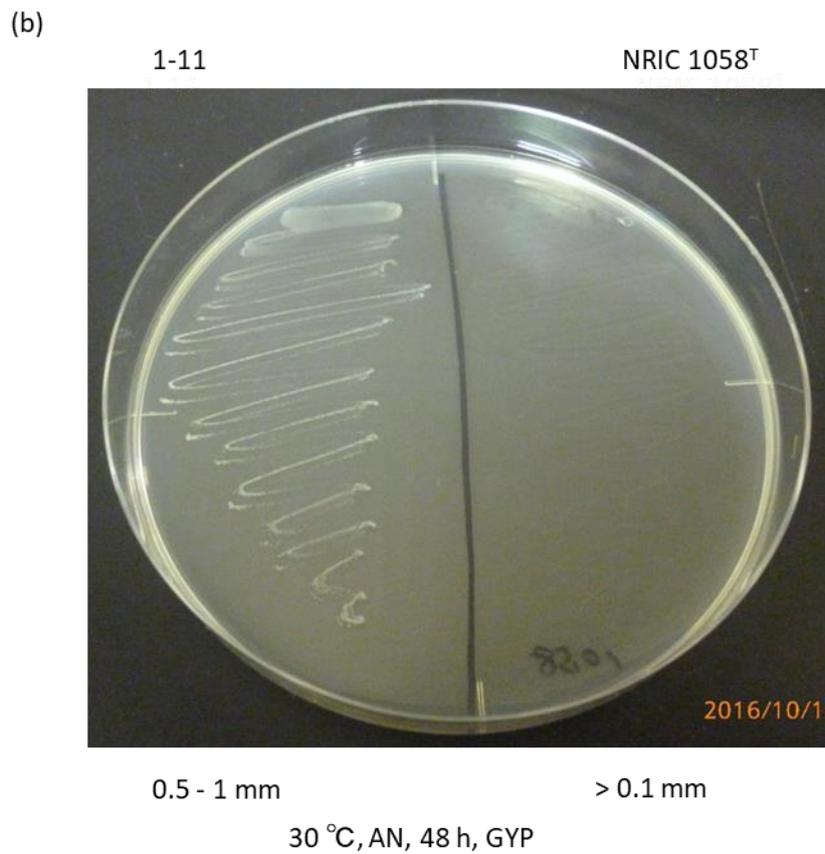
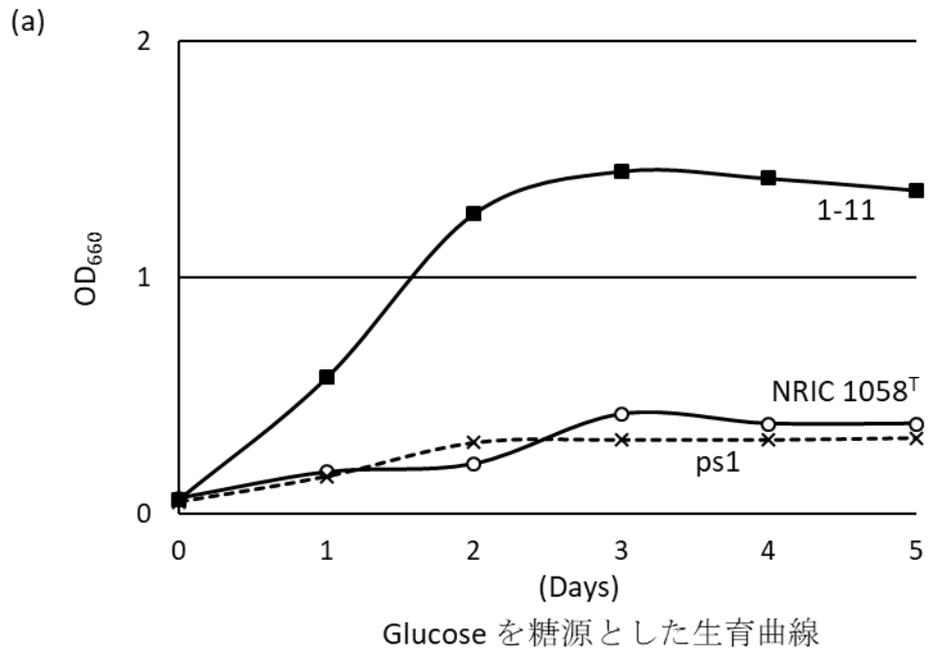


Fig. 20. *adhE* を有する *F. fructosus* の GYP 培地での生育

次に、グルコースを代謝した際の代謝産物を酵素法で測定した。親株と ps1 株は乳酸とエタノール、酢酸のモル比が 1:0.1:1.5、1:0.1:1.6(=乳酸 (L): エタノール (E): 酢酸 (A)) であり、1-11 株は 1:1.1:0.1(=L:E:A) であった (Table 18)。一般的なヘテロ発酵乳酸菌は乳酸とほぼ等モルのエタノールと少量の酢酸を生産し、FLAB はエタノールを生産せず、酢酸を生産することが知られている (15)。*adhE* を導入された 1-11 株は一般的なヘテロ発酵乳酸菌と同様に乳酸とエタノールをほぼ等モルで生産し、酢酸の生産はごく少量であったことから (Table 21)、FLAB はエタノール生産に関わる *adhE* の欠損によりグルコースを代謝し、酢酸を生産していることが明らかになった。一般的なグルコースのヘテロ発酵により、乳酸と二酸化炭素とエタノール生産過程で 1 mol の ATP が生産される。また、乳酸菌は *glucokinase* を使って、アセチルリン酸から酢酸を生産する過程で 1 mol の ATP を獲得することが出来る。FLAB は *adhE* を欠損させ、酢酸を生産することから、グルコースをヘテロ発酵することで合計 2 mol の ATP を獲得し、これは一般的なヘテロ発酵と比べ 2 倍のエネルギー効率を有していることとなる。FLAB は *adhE* を欠損させることで、エネルギー効率を向上させるという、微生物間競争を行ってきている可能性が強く示唆された。

Table 21. 酵素法によるグルコースからできる代謝産物の測定

Strain	消費 グルコース (mM)	乳酸 (L) (mM)	エタノール (E) (mM)	酢酸 (A) (mM)	L:E:A	対糖収率 (%)
<i>F. fructosus</i> NRIC 1058 ^T	10.1	10.3	1.1	15.4	1:0.1:1.5	105
<i>F. fructosus</i> 1-11	53.7	46.6	52.3	2.1	1:1.1:0.1	77
<i>F. fructosus</i> ps1	9.1	10.0	1.0	15.8	1:0.1:1.6	115
<i>Leuc. mesenteroides</i> NRIC 1541 ^T	ND	33.2	33.0	4.8	1:0.9:0.1	ND

また、フルクトフィリック乳酸菌は、代謝可能な糖の種類が少ないという特徴を有していることが報告されている (15)。*adhE* で形質転換した *F. fructosus* は一般的なヘテロ発酵乳酸菌と同様に GYP 培地で良好な生育をみせるようになった。*adhE* の欠損が他の糖の代謝にも影響を与えている可能性を評価するために、API 50 を用いて 49 種類の炭水化物基質を代謝するのか親株と比較した (Table 19)。その結果、親株及び ps1 株はグルコース、フルクトース、マンニトールの 3 種類の糖しか代謝せず (Table 19)、*adhE* を有している形質転換株 1-11 株もグルコースを他の 2 菌株よりも早く代謝したが、親株と同じ 3 種類の糖しか代謝をすることができなかった。この結果から *Fructobacillus* 属細菌に *adhE* を形質転換することでグルコース代謝が促進されたが、他の糖代謝には影響を及ぼさないことが明らかになった。

これまでに *Fructobacillus* 属細菌はなぜグルコース以外の糖も代謝できないのか検討されていない。そこで、*F. fructosus* NRIC 1058^T 株のゲノムデータから糖代謝系を予測し、図にまとめた (Fig. 19)。乳酸菌が代謝する主要な 14 種類の単糖及び二糖の代謝経路を予測したところ、一般的な乳酸菌は PTS や ABC トランスポーターによって取り込まれるラクトースやマルトース、セロビオースといった 7 種の糖の取り込み系が見出せなかった。また、リボース、アラビノース、キシロースといったペントースやガラクトースは取り込みが予測される ABC トランスポーターが見出されたものの、取り込み後の代謝に使われる一部の遺伝子を見出すことができず、そのためこれらの糖を代謝できないことが考えられた。

adhE は多くの糖代謝においてグルコース代謝と同様に重要な役割を担っているが、*F. fructosus* は *adhE* のみならず、様々な糖の取り込み系や代謝経路の一部を欠落させて来たことが明らかとなった。これらの結果から、*Fructobacillus* 属はフルクトース豊富な環境に適応するために *adhE* だけでなく、様々な糖代謝関連遺伝子を欠損させるという退行的進化を行ってきたことが明らかになった。

Table 22. API50 CHL を用いた *F. fructosus* の糖代謝能の評価

Strain	NRIC 1058 ^T	1-11	ps1
グルコース	5 days	<u>1 day</u>	5 days
フルクトース	1 day	1 day	1 day
マンニトール	5 days	5 days	5 days

第 3 節 要約

第二章では *Fructobacillus* 属細菌が有するフルクトフィリックな特徴を決定づける鍵として考えられている *adhE* の欠損が、それらの生育特性に与える影響を明らかにすることを目的として、*F. fructosus* NRIC 1058^T 株を近縁菌種である *Leuconostoc mesenteroides* NRIC 1541T 株の *adhE* で形質転換し、その形質転換株の生育特性を解析した。*adhE* で形質転換した *F. fructosus* は、親株と異なり、グルコースを糖源とする培地で良好な生育を見せた。このことから、*Fructobacillus* 属は *adhE* を欠損させることで、フルクトフィリックな特徴を有していることが明らかとなった。ヘテロ発酵乳酸菌は一般的に、グルコースを代謝することで、乳酸と二酸化炭素とエタノールを生産し、その過程でグルコース 1 分子から、1 ATP が生産される。しかし、FLAB はエタノールではなく、acetate kinase により酢酸を生産することで、グルコース 1 分子から一般的なヘテロ発酵乳酸菌の 2 倍にあたる、2 ATP を生産することが可能である。このようにして、FLAB は *adhE* を欠損することで、エネルギー効率において微生物間競争を有利にしていることが示唆された。さらに、FLAB の糖代謝能が乏しい理由を明らかにするために、*F. fructosus* のゲノムデータから主要な単糖や二糖の糖代謝経路の探索を行ったところ、糖の取り込み系をほとんど見出せず、また取り込み系を保持していても代謝経路の一部が欠落しているため、代謝可能な糖の種類が少ないことが明らかとなった。

本章にある内容は “Introduction of bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*) in *Fructobacillus fructosus* settled its fructophilic characteristics.” というタイトルで *Research in Microbiology* に 2018 年に報告した。

第 3 章 *Leuconostoc citreum* F192-5 株が行ってきた菌株特異的な進化

序

第 1 章及び第 2 章では、*Fructobacillus* 属に分類されるすべての菌種がフルクトフィリックな特徴を有するという“属レベルの進化”、*Lactobacillus kunkeei* および *Lactobacillus apinorum* に分類されるすべての菌株がフルクトフィリックな特徴を有するという“種レベルの進化”について報告した。これらはゲノムサイズを小さくし、代謝系をシンプルにするというだけでなくフルクトース豊富な環境に適応し、よく似た代謝系を保存するというゲノムの特徴を有していることを明らかにしてきた (27, 93, 94)。

Leuconostocaceae の基準属である *Leuconostoc* 属は *Fructobacillus* 属細菌とは異なり、グルコースを代謝できないという典型的なフルクトフィリックな特徴を有しておらず、いわゆる“一般的なヘテロ発酵乳酸菌”として知られている。植物環境や発酵食品、乳製品や我々の腸内など非常に幅広い環境から見出され (95-97)、系統的に *Fructobacillus* 属とは近縁菌群にあたることが知られている (Fig. 22)。

我々が FLAB の生態学的研究を進めている中で南アフリカのミカンの皮より特異的な生育特性を持つ F192-5 株が見出された。本株はフルクトフィリック様の特徴を示す一方で、典型的な乳酸菌である *Leuconostoc citreum* に分類された。*Leuc. citreum* は植物質環境や発酵食品から分離される乳酸菌であり、一般的によく知られる乳酸菌のヘテロ発酵を行う。*Leuc. citreum* はこれまでにフルクトフィリックな特徴を有しているという報告はなく、乳酸菌全体を見ても菌株特異的にフルクトフィリックな特徴を有している菌株が見出された報告はない。そこで、本章ではまず、F192-5 株の生育特性をほかの *Leuc. citreum* 菌株と比較すること

で明らかにした。また、本株とほかの *Leuc. citreum* との比較ゲノム解析を行い、フルクトフィリックな表現性状のカギとなる *adhE* 遺伝子に着目した解析を行うことで菌株特異的なフルクトフィリックな進化に迫った。

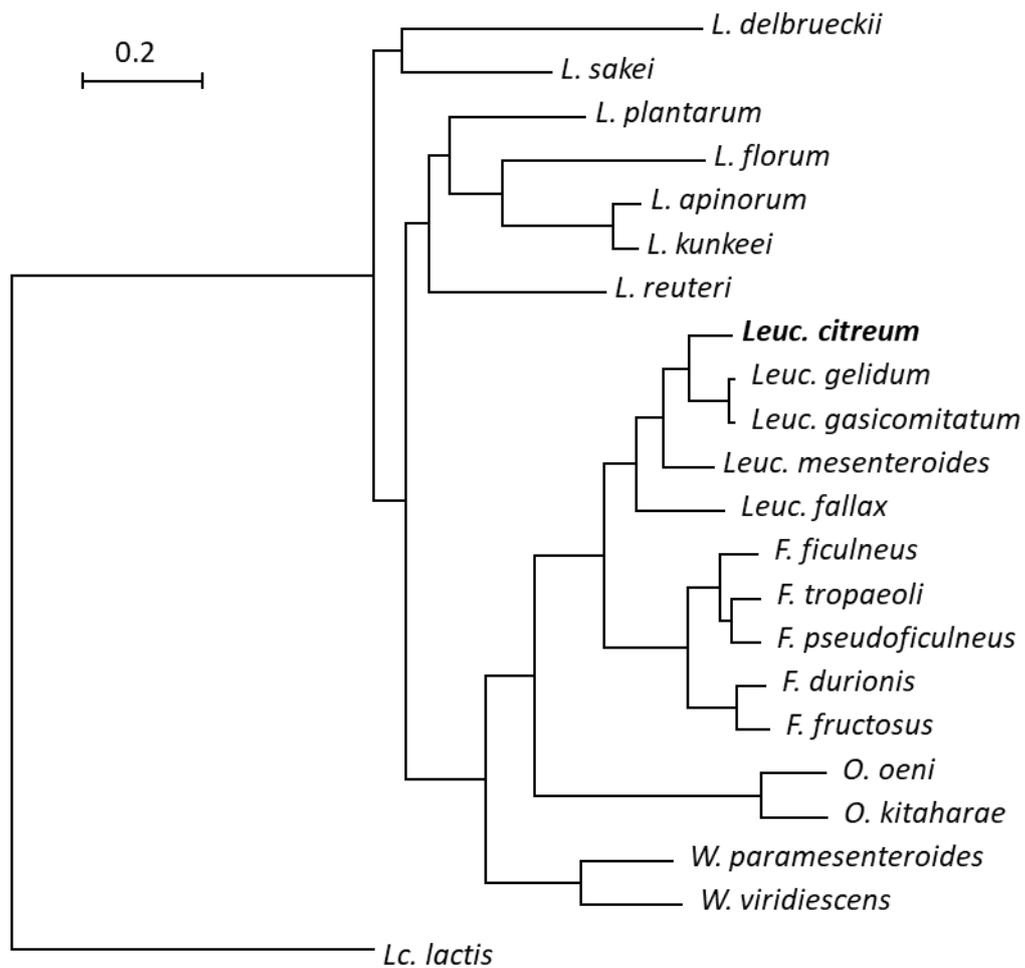


Fig. 22. コアゲノムに基づく系統樹から示される *Leuconostoc citreum* の系統的位

第 1 節 *Leuconostoc citreum* F192-5 株の表現性状解析

南アフリカのステレンボッシュのマーケットで購入したミカンの皮から分離され、フルクトフィリック様の特徴を有している F192-5 株の生育特性をほかの *Leuc. citreum* 菌株と比較し、明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

1. 使用菌株

本節では *Leuc. citreum* NRIC 1776^T 株、NRIC 1772 株、NRIC 1581 株、NRIC 1579 株、F192-5 株を用いた。本研究で用いた菌株は Table 23 に示した。

Table 23. 本研究での使用菌株

Bacterial strain	Description
<i>Leuconostoc citreum</i> NRIC 1776 ^T	Reference strain (Type strain)
<i>Leuconostoc citreum</i> NRIC 1772	Reference strain
<i>Leuconostoc citreum</i> NRIC 1579	Reference strain
<i>Leuconostoc citreum</i> NRIC 1581	Reference strain
<i>Leuconostoc citreum</i> F192-5	Wild type (fructophilic-like isolate)

2. D-グルコースを生育基質とした時の F192-5 株とほかの *Leuc. citreum* 菌株の生育度の比較

第 1 章 3 節項目 5 と同様に菌液を調整後、経時的に生育度を測定し、生育曲線を描画した。試験培地及び培養条件は GYP 培地の静置培養および振とう培養、1% ピルビン酸添加 GYP 培地、FYP 培地の 4 条件を設定し、それぞれの条件下での生育を比較した。

3. 酵素活性試験のための粗酵素液の調整及び Adh/Aldh 活性測定

F192-5 株は 5 mL の GYP 培地に -80°C から接種し、30°C で一晩振とう培養 (120 rpm) を行った後、200 mL の GYP 培地に移し、もう一晩静置培養を行った。その培養液にさらに、700 mL の GYP 培地を加え、一晩静置培養を行った。*Leuc. citreum* NRIC 1776^T 株は 5 mL の GYP 培地に -80°C から接種し、30°C で一晩静置培養を行った後、200 mL の GYP 培地に移し、もう一晩静置培養を行った。その後、第 1 章第 3 節項目 2、3 と同様に回収及び調整と酵素活性の測定を行った。

4. D-グルコース代謝時の最終代謝産物

-80°C から F192-5 株は 1 mL の FYP 培地に接種し、それ以外の菌株は 1 mL の GYP 培地に接種し、30°C で一晩静置培養を行った。培養された菌液を NaAc を含まない GYP 培地に 50 分の 1 量接種し、一晩静置培養した後、第 2 章第 2 節項目 3 と同様に測定を行った。サンプルの希釈倍率は Table 24 に示した。

Table 24. *Leuc. citreum* の代謝産物測定のための希釈

	F192-5	その他の <i>Leuc. citreum</i>
グルコース	100 倍希釈液	原液
乳酸	100 倍希釈液	100 倍希釈液
エタノール	原液	100 倍希釈液
酢酸	100 倍希釈液	原液

5. F192-5 株の糖代謝能の評価

Leuconostoc citreum F192-5 株は 1 mL の FYP 培地で、30°C の環境で一晩静置培養を行った。その後 API 50 CHL を用いて、第 2 章第 2 節項目 4 と同様に試

験し、評価を行った。

【結果と考察】

これまでに乳酸菌において菌株特異的にフルクトフィリックな特徴を有する菌株は報告されていないため、まず本節では F192-5 株の菌株特異的なフルクトフィリックな特徴について評価した。*Leuc. citreum* NRIC 1776^T 株、NRIC 1772 株、NRIC 1579 株、NRIC 1581 株はグルコースを糖源とする GYP 培地で培養を行うと良好な生育を示した (Fig. 23)。その一方で、F192-5 株は GYP 培地でほとんど生育せず、660 nm における吸光度も 5 日間を通して一度も 0.5 を上回ることはなかった。F192-5 株は FYP 培地及び、電子受容体存在下の GYP 培地では GYP 培地での生育と対照的に良好な生育を見せ (Fig. 23)、ほかの *Leuc. citreum* とほとんど変わらない生育度を示した。また、グルコースを代謝した時に生産される最終代謝産物の測定を行った。その結果、基準株を含む比較対象の 4 株とも乳酸とエタノールをほぼ等モル生産していた (Table 25)。一方で、F192-5 株は乳酸とほぼ等モルの酢酸を生産し、エタノールの生産量はわずかであった。これらの特徴は *Fructobacillus* 属細菌や *L. kunkeei* にみられたフルクトフィリックな特徴と完全に合致しており、F192-5 株はフルクトフィリックな生育特性を有していることが明らかになった。

これまでの FLAB と同様に、F192-5 株の代謝可能な糖の種類が少ないのか API 50 CHL を用いて F192-5 株の 49 種類の糖代謝能について評価した。基準株は 49 種類の糖のうち 15 種類の糖 (アラビノース、キシロース、グルコース、フルクトース、マンノース、マンニトール、メチル α グルコピラノシド、N-アセチルグルコサミン、アルブチン、サリシン、セロビオース、マルトース、スクロース、トレハロース、ツラノース) を 5 日目までに代謝し、4 種類の糖 (ガラクト

ース、アミグダリン、ゲンチビオース、2-ケトグルコン酸) を 7 日間で弱く代謝した。F192-5 株は基準株と同じ種類の糖を代謝した (Table 26) 。F192-5 は代謝可能な糖の種類数が少ないという点においてこれまでの FLAB の特徴とは全く異なっていることが明らかとなった。

これらの結果から、F192-5 株は様々な糖の代謝を行うことができる一方で、生物の一般的な生育基質であるグルコースだけほとんど代謝しないという特徴を有していることが明らかとなった。

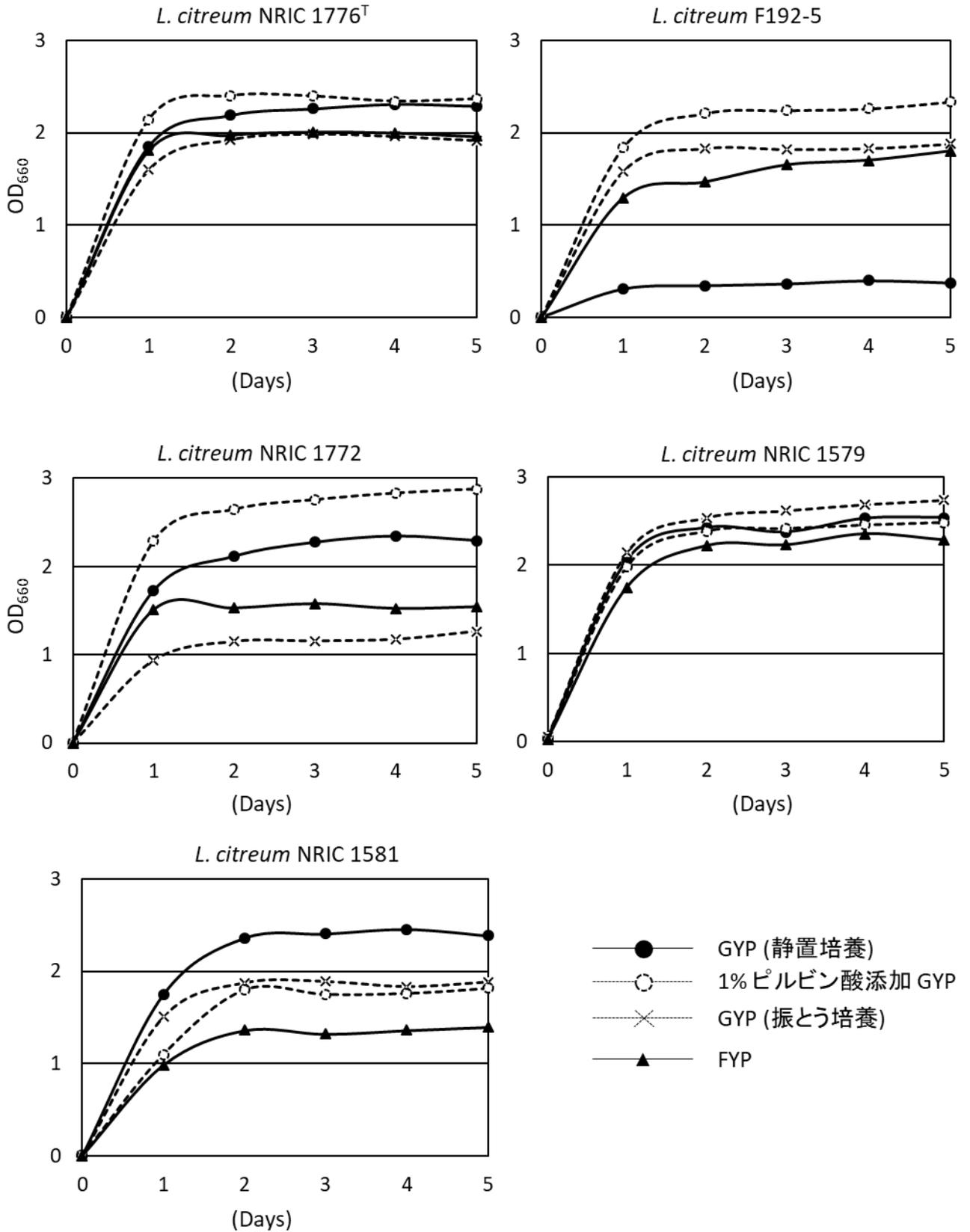


Fig. 23. *Leuconostoc citreum* の生育曲線

Table 25. グルコース代謝の最終産物

Strain	消費 グルコース (mM)	最終産物 (mM)			L:E:A	対糖収率 (%)
		乳酸 (L)	エタノール (E)	酢酸 (A)		
NRIC 1776 ^T	51.3	56.3	47.8	1.9	1:0.9:0.0	87.2
NRIC 1772	51.4	52.4	45.5	3.2	1:0.9:0.1	82.6
NRIC 1579	51.3	51.8	44.2	1.9	1:0.9:0.0	80.4
NRIC 1581	51.4	53.3	45.7	3.3	1:0.9:0.1	83.6
F192-5	13.9	14.6	0.2	14.1	1:0.0:1.0	86.7

Table 26. F192-5 株の糖代謝能の評価

Carbohydrate	Days	Carbohydrate	Days
Control	-	Esculin ferric citrate	-
Glycerol	-	Salicin	2
Erythritol	-	D-Cellobiose	5
D-Arabinose	-	D-Maltose	1
L-Arabinose	1	D-Lactose	-
D-Ribose	-	D-Melibiose	-
D-Xylose	5	D-Sucrose	1
L-Xylose	-	D-Trehalose	2
D-Adonitol	-	Inulin	-
Methyl-βD-xyloryranoside	-	D-Melezitose	-
D-Galactose	w	D-Raffinose	-
D-Glucose	2	Starch	-
D-Fructose	1	Glycogen	-
D-Mannose	2	Xylitol	-
L-Sorbose	-	Gentibiose	w
L-Rhamnose	-	D-Turanose	1
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
D-Mannitol	5	D-Fucose	-
D-Sorbitol	-	L-Fucose	-
Methyl-αD-mannopyranoside	-	D-Arabitol	-
Methyl-αD-glucoopyranoside	2	L-Arabitol	-
N-Acetylglucosamine	2	Gluconate	w
Amygdalin	w	2-Keto gluconate	w
Arbutin	2	5-Keto gluconate	-

第 2 節 F192-5 株とほかの *Leuc. citreum* 菌株との比較ゲノム解析

Fructobacillus 属細菌と *L. kunkeei* は糖代謝関連遺伝子を特異的に欠落させ、代謝系をシンプルにしてきたことを明らかにした。F192-5 株がフルクトース豊富な環境でどのように適応してきたのかを明らかにするため、ほかの *Leuc. citreum* 菌株との比較ゲノムゲノム解析を行った。

【実験方法】

1. *Leuconostoc citreum* F192-5 株と NRIC 1541^T 株の培養と DNA 抽出

Leuc. citreum F192-5 株を 1 mL の FYP 培地にて NRIC 1541^T 株を 1 mL の GYP 培地にて、30 °C で 24 時間培養を行った。第 1 章 1 節項目 2 と同様に DNA を抽出した。

2. F192-5 株と NRIC 1776^T 株のドラフトゲノムの決定とアセンブリ、アノテーション

ドラフトゲノムは次世代シーケンサー Illumina Miseq を使い、インサートの長さは 500 bp を使用した。F192-5 株は 5,502,480 リードを読み、その平均は 294 bp であった。NRIC 1776^T 株は 6,743,618 リードを読み、その平均は 275 bp であった。アセンブリはショートリード用の Platanus B を用いて行い (98)、F192-5 株は 42 個のコンティグで N₅₀ は 161,012 bp であり、2,061,777 bp からなるドラフトゲノムを得た。また、NRIC 1776^T 株は 8 個のコンティグからなり N₅₀ は 1,253,651 bp で、1,806,779 bp からなるドラフトゲノムを得た。アノテーションは DFAST で行った (49)。シークエンスカバレッジは、F192-5 株は 785-fold、NRIC 1776^T 株は 1,028-fold であった。

3. データの登録

Leuconostoc citreum F192-5 株、NRIC 1776^T 株のシーケンスデータは DDBJ/EMBL/GenBank International Nucleotide Sequence Database に登録した。アクセスセッション番号は BJJW01000000.1、BJJX01000000.1 であった (Table 27)。

Table 27. 比較ゲノム解析に用いた *Leuc. citreum* のゲノム情報

Strains	Genome size (Mbp)	Number of CDSs	GC%	Genome status ¹	Contamination (%) ²	Completeness (%) ²	Accession number
F192-5	2.06	2,051	38.4	D	4.02	98.67	BJJW01000000.1
NRIC 1776 ^T	1.81	1,781	38.9	D	1.49	99.65	BJJX01000000.1
1301_LGAS	1.82	1,784	39.0	D	0.56	97.69	NZ_JVUU00000000.1
NRRL B-1299	1.75	1,717	39.0	D	0.23	98.63	NZ_CCNH00000000.1
NRRL B-742	1.75	1,749	39.0	D	0.21	97.50	NZ_CCNG00000000.1
DmW_111	1.83	1,847	38.8	D	2.67	98.67	NZ_NDXG00000000.1
KM20	1.90	1,915	38.9	C	0.03	99.65	NC_010471.1
LBAE C10	1.93	1,939	38.8	D	1.18	99.59	NZ_CAGE00000000.1
LBAE C11	1.97	1,976	38.7	D	0.52	99.65	NZ_CAGF00000000.1
LBAE E16	1.80	1,806	38.9	D	0.03	99.65	NZ_CAGG00000000.1

¹ゲノムデータの種類; D, ドラフトゲノム; C, コンプリートゲノム。

²CheckMで *Leuconostoc* 属のゲノムでを基にクオリティーの確認。

4. そのほかの *Lactobacillus* 属細菌と *Fructobacillus* 属細菌のゲノムデータ

ほかの *Leuc. citreum* 菌株のドラフト (および、コンプリート) ゲノムは NCBI のゲノムアーカイブ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) からアノテーション済みのデータを取得し、DFAST でアノテーションをやり直した (49)。それぞれのゲノムデータのアクセス番号は Table 24 に示した。ゲノムデータのクオリティーを評価するため、checkM (Version 1.0.4) にて評価を行った (50)。ゲノムのクオリティーチェックは “genus *Leuconostoc*” をマーカーとして用い checkM を行った。

5. ゲノムデータの解析と統計処理

それぞれの菌種のゲノムサイズや遺伝子数といった基本的なデータは R を用いて箱ひげボックスを描画 (boxplot) した。遺伝子の機能分類は、COGNITOR software を用いて Cluster of Orthologues Groups (COG) を決定した (59)。代謝経路予測を KEGG Automatic Annotation Service (KAAS) を用いて行い、様々な経路にかかわる遺伝子を調べた (60)。KAAS の GENES data set としては *L. kunkeei* のゲノム解析と同じ sce, pfa, eco, sty, hin, pae, nme, hpy, rpr, mlo, bsu, sau, lla, spn, cac, mge, mtu, ctr, bbu, syn, aae, mja, afu, pho, ape, llm, lpl, lca, lcb, lbr, lre, lrf, lsa, lhe, lfe, ppe, efa, ooe, lme, wko の 40 菌種を用いた。

L. citreum の保存遺伝子は、GET_HOMOLOGUES software (version1.3) を用いて、すべてのタンパク質のオーソログを調べた (53)。そこから *Leuc. citreum* の菌株特異的遺伝子及び特異的欠損遺伝子を見出した。遺伝子の相同性検索は BLASTP 解析を用いて行った。また、今回用いた塩基配列データを基に ANI を決定した (51)。また、第 1 章 1 節と同じプログラムでコアゲノムを抽出し、系統樹を作成した。

【結果と考察】

F192-5 株と基準株である NRIC 1776^T 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を比較したところ 99.7% の相同性を示した。また、ANI の値が 0.95 以上の値を示すと同一菌種であると判断できると考えられており、*Leuc. citreum* 間の ANI の値は 0.986 から 0.998 を示し、基準株と F192-5 株の ANI の値は 0.993 を示したことから、F192-5 株は *Leuc. citreum* に分類されることが示された (Table 28)。

F192-5 株はゲノムサイズが 2.06 Mbp あり、遺伝子数は 2,051 個であった。ほかの *Leuc. citreum* はゲノムサイズが 1.84 Mbp (SD; ±0.08 Mbp) で、遺伝子数は

1,835 個 (SD; ± 90 個) であった (Fig. 24)。ほかの *Leuc. citreum* 菌株と比べて F192-5 株のゲノムサイズおよび遺伝子数は同程度以上であり、FLAB の代表菌群である *Fructobacillus* 属細菌のゲノムと比較して、F192-5 株は非常に大きなゲノムを有していることが明らかとなった。FLAB はゲノムサイズを小さくするという退行的進化を行ってきたことから、F192-5 株は *Fructobacillus* 属や *L. kunkeei* とは異なる進化の様式をたどってきた可能性が考えられた。

Table 28. *Leuc. citreum* の菌株間の ANI 値

	BN962	F192-5	KM20	LBAEC10	LBAEC11	LBAEC16	NRIC1776 ^T	NRRL.B-1299
BN962	-							
F192-5	0.992	-						
KM20	0.994	0.990	-					
LBAEC10	0.992	0.986	0.991	-				
LBAEC11	0.993	0.987	0.990	0.989	-			
LBAEC16	0.993	0.992	0.997	0.992	0.993	-		
NRIC1776 ^T	0.993	0.993	0.993	0.992	0.992	0.992	-	
NRRL.B-1299	0.994	0.992	0.993	0.993	0.993	0.992	0.992	-

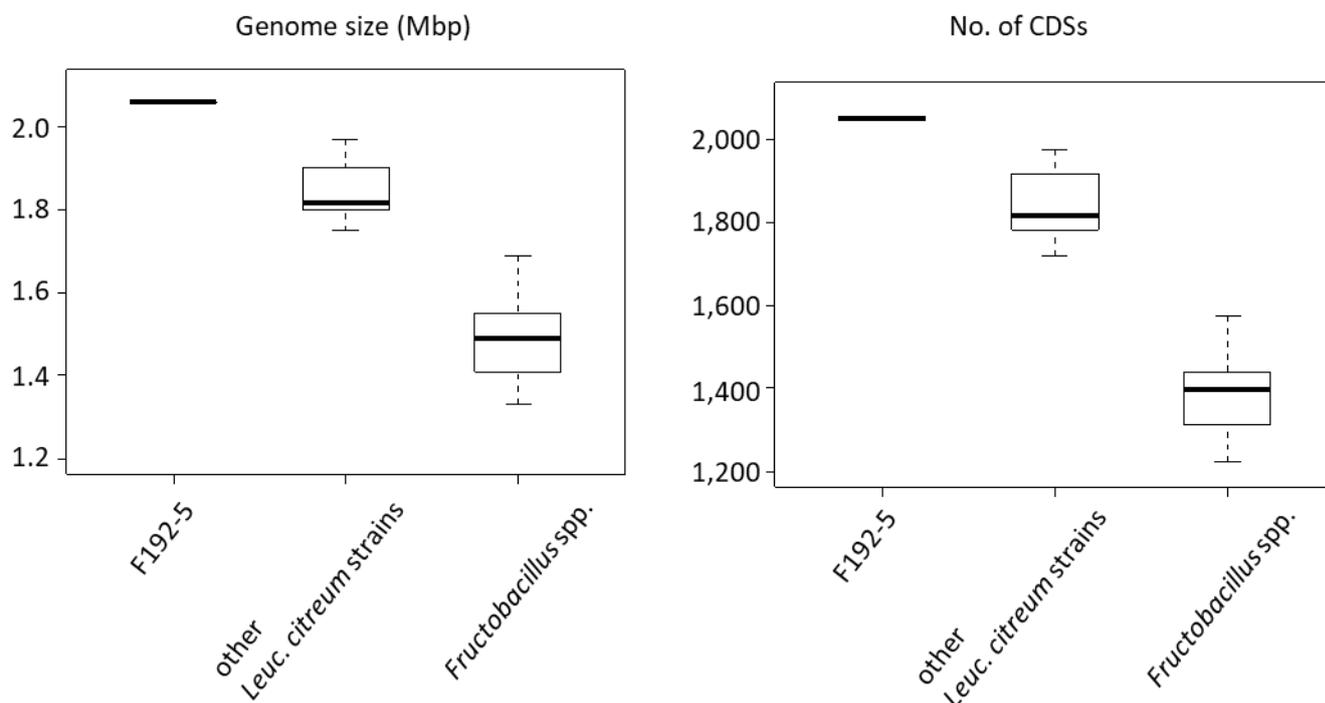


Fig. 24. *Leuconostoc citreum* のゲノムサイズと遺伝子 (CDS) 数

次に、*Leuc. citreum* の COG データベースに従って、遺伝子を機能ごとに分類した (Table 29)。F192-5 株は Class E のアミノ酸代謝にかかわる遺伝子群、class G の糖代謝にかかわる遺伝子群、class J の翻訳にかかわる遺伝子群および class K の転写にかかわる遺伝子群においてほかの *Leuc. citreum* 菌株より遺伝子を多く保持していた。そのほかの遺伝子群においては菌株間に若干の差が見られたが、ほとんどの *Leuc. citreum* で大きな違いはなく、F192-5 株に突出した明らかな特徴は見出されなかった (Table 29)。また、KAAS により代謝経路予測を行った。F192-5 株もほかの FLAB と同様に酸素により生育が劇的に促進されるが、ほかの *Leuc. citreum* 菌株と同程度の数の Oxidative phosphorylation (ko00190)、Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis (ko00130) しか持たず、一般的に乳酸菌は酸素を呼吸に用いないことから、F192-5 株も酸素を呼吸ではなく、電子

受容体として用いていることが推測された。これまで、FLAB は糖の取り込みにかかわる Phosphotransferase system (PTS) (ko02060) や ABC transporters (ko02010) を欠落させていたが、F192-5 株にそれらの特異的な欠落は見られなかった (Table 30)。また、*Fructobacillus* 属や *L. kunkeei* が欠落させていた、Fructose and mannose metabolism (ko00051) や Pentose phosphate pathway (ko00030) といった代謝経路において、ほかの *Leuc.citreum* とほとんど変わらない数の遺伝子を保存させていたことから、F192-5 株はほかの FLAB とは全く異なるゲノムの特徴を有していることが明らかとなった (Table 30)。

Table 29. *Leuconostoc citreum* のゲノムを構成する遺伝子機能群

Strain names	F192-5	NRIC 1776 ^T	1301_LGAS	NRRL B-1299	NRRL B-742	DmW_111	KM20	LBAE C10	LBAE C11	LBAE E16
C; Energy production and conversion	69	62	64	65	63	63	65	64	72	65
D; Cell cycle control and mitosis	36	33	42	34	31	37	33	41	41	38
E; Amino Acid metabolism and transport	154	140	145	148	148	142	142	144	149	140
F; Nucleotide metabolism and transport	92	90	88	89	88	89	88	95	91	89
G; Carbohydrate metabolism and transport	171	161	164	157	151	159	158	162	178	148
H; Coenzyme metabolism	89	88	86	89	86	87	85	90	90	87
I; Lipid metabolism	75	72	71	72	69	72	74	71	77	75
J; Translation	197	190	188	188	186	193	188	193	189	189
K; Transcription	172	149	134	136	128	146	133	148	153	139
L; Replication and repair	120	100	101	97	92	105	99	120	118	104
M; Cell wall/membrane/envelop biogenesis	119	100	107	105	101	104	111	111	119	113
N; Cell motility	23	20	21	17	17	14	15	20	21	17
O; Post-translational modification, protein turnover, chaperone functions	65	57	56	55	53	56	60	71	70	66
P; Inorganic ion transport and metabolism	89	81	88	84	78	83	87	93	94	87
Q; Secondary Structure	27	27	26	26	26	28	26	29	31	30
R; General Functional Prediction only	158	147	139	143	136	145	141	151	159	142
S; Function Unknown	130	123	115	112	108	131	118	118	127	122
T; Signal Transduction	73	69	65	61	65	65	68	72	72	69
U; Intracellular trafficking and secretion	19	20	17	18	17	18	18	20	18	18
V; Defense mechanisms	51	38	43	37	33	38	40	47	43	39
X; Mobilome: prophages, transposons	42	18	37	26	40	32	28	29	35	28

Table 30. *Leuconostoc citreum* に保存されている代謝経路

ko define	Pathway	F192-5	Other <i>Leuc. citreum</i> strains (SD)
ko01200	Carbon metabolism	38	38 (1.2)
ko00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	18	18 (0.0)
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	6	6 (0.0)
ko00030	Pentose phosphate pathway	13	13 (0.7)
ko00051	Fructose and mannose metabolism	9	9 (0.5)
ko00190	Oxidative phosphorylation	14	14 (0.0)
ko00130	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	9	9 (0.3)
ko02010	ABC transporters	57	56 (1.9)
ko02060	Phosphotransferase system (PTS)	14	12 (1.7)

次に、10 菌株の *Leuc. citreum* のコアゲノムとパンゲノムを双方向のベストヒット方式により、オルソログな遺伝子をクラスタリングすることによって決定した。その結果 1,357 個のコア遺伝子と 7,536 個のアクセサリ遺伝子からなる 8,893 個のパンゲノムを取得した。10 菌株の *Leuc. citreum* の CDS 数の平均が 1,856.5 個なので、約 70% の遺伝子を *Leuc. citreum* が共有していることが明らかになった。次にこの結果を基に、各菌株のオルソログクラスタリングによって特異的遺伝子と特異的欠損遺伝子を決定した。特異的遺伝子はその該当菌株のみが有しており、そのほかの菌株は持っていない遺伝子を示し、特異的欠損遺伝子はその該当菌株のみが欠損させており、そのほかの全ての菌株には保存されている遺伝子を示した (Fig. 25)。その結果、特異的遺伝子が最も多い菌株は LBAE C11 株で 175 個、最も少ない菌株は NRIC 1776^T 株で 16 個有していた。また、特異的欠損遺伝子が最も多い菌株は LBAE C11 株で 39 個、最も少ない菌株は NRIC 1776^T 株、F192-5 株、1301_LGAS 株が 1 個有していた。F192-5 株は 123 個の特異的遺伝子を有しており、1 個の遺伝子を菌株特異的に欠損していた。LBAE C11 株や LBAE C10 株は特異的遺伝子が非常に多く、ゲノムを占める遺伝子数のうち約 10% も特異的遺伝子であるということは考えにくいので、NCBI の BLASTP によりマニュアルで相同性検索を行い、本当にそれぞれの菌株特異的な遺伝子なのかより詳細に解析を行い、集計した (Table 31)。今回の BLASTP 解析は特異的遺伝子のアミノ酸配列を query として、検索にかけ Coverage が 50% 以上、Identity が 50% 以上を示したタンパク質を同一タンパク質とみなした。BLASTP 解析の結果、特異的遺伝子は最も少ないもので NRRL B-742 株が 1 個、多い菌株では F192-5 株と LBAE C10 株が 68 個であった。解析の途中で、*Fructobacillus* 属細菌と共有している特異的遺伝子が存在していることを見出した。そこで、各菌株の特異的遺伝子のうち *Fructobacillus* 属と共有している遺伝子数を集計した (Table 31)。その結果、F192-5 株は 7 個の菌株特異的遺伝子を

Fructobacillus 属細菌と共有していることが明らかとなった。その遺伝子は abortive infection gene product AbiN (LCF192_00301)、DNA replication initiation protein (LCF192_00358)、type II toxin-antitoxin system antitoxin (LCF192_00692)、RelB/DinJ family (LCF192_00692)、zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein (LCF192_01493)、phage portal protein (LCF192_01738)、hypothetical protein (LCF192_00358) であった。*Fructobacillus* 属は alcohol dehydrogenase を特異的遺伝子として保持していることが明らかにされており (27)、今回 F192-5 株は *Fructobacillus* 属細菌と共有している特異的遺伝子に zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein (LCF192_01493) があつたことから、フルクトース豊富な環境下で生息するのに何らかの理由で alcohol dehydrogenase が必要である可能性が考えられた。

コアゲノムを用いて 11 菌株の *Leuc. citreum* の系統関係を明らかにするために系統樹を作成した (Fig. 26)。F192-5 株は他の菌株と比較して、やや大きなゲノムを有しており、特異的遺伝子を 68 個も有しており、そのうちいくつかは *Fructobacillus* 属細菌と遺伝子を共有しているという点で他の菌株と系統的に少し離れていることが予想されたが、系統樹では他の *Leuc. citreum* と混在していた。これは、F192-5 株のゲノム上の遺伝子のうち約 3% は他の *Leuc. citreum* が有していない特異的遺伝子ではあるものの、コアゲノムの部分は他の *Leuc. citreum* とはほとんど差がないためこのような結果になったと考えられる。この点から、F192-5 株はフルクトース豊富な環境下に生息する過程で、他の *Leuc. citreum* 菌株にみられない遺伝子をはじめとした遺伝子を獲得することで、環境適応してきた可能性が考えられた。

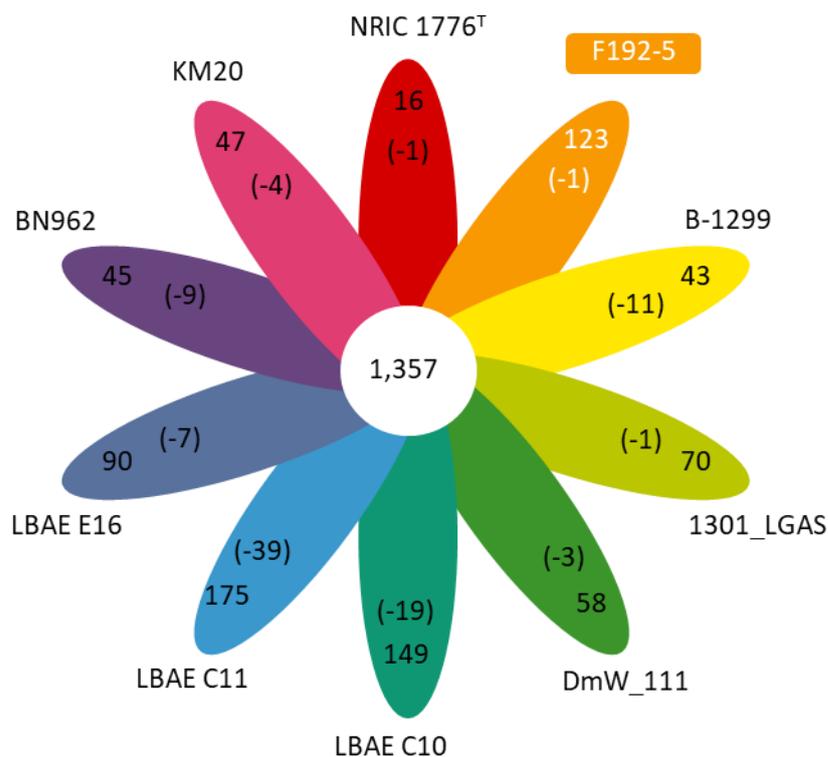


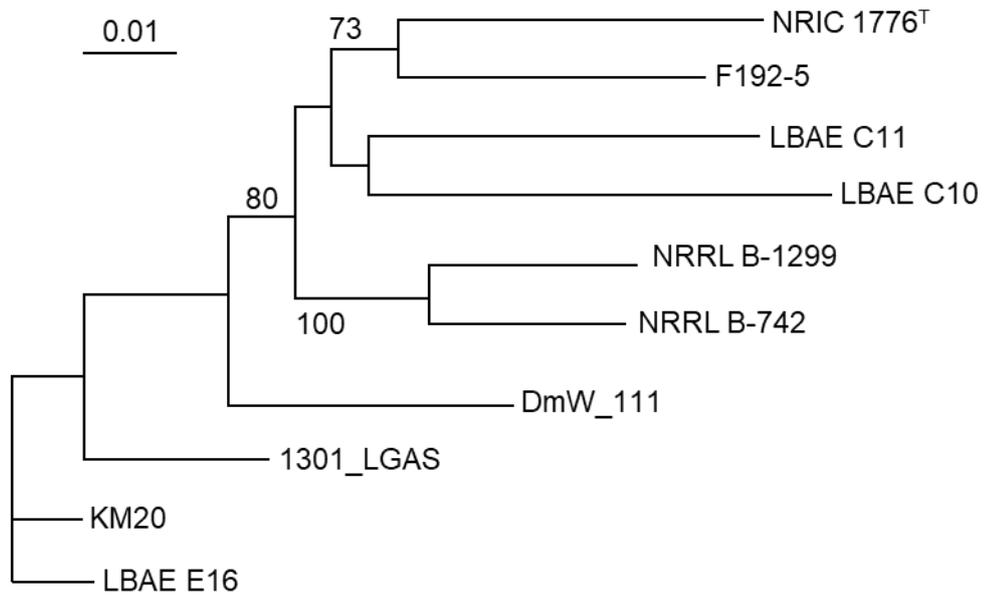
Fig. 25. *Leuconostoc citreum* のゲノムサイズと遺伝子 (CDS) 数

中央の数字はコアゲノム数を示しており、花びらの括弧がない数字は菌株特異的遺伝子数、括弧付きの数字は菌株特異的欠損遺伝子の数を示している。

Table 31. 2つの解析方法による特異的遺伝子数と *Fructobacillus* 属細菌と共有している遺伝子数

	特異的遺伝子数		<i>Fructobacillus</i> spp. と共有している遺伝子数
	Orthologous clustering	BLASTP analysis	
F192-5	123	68	7
NRIC 1776 ^T	16	5	1
1301_LGAS	70	23	0
NRRL B-1299	43	10	1
NRRL B-742	45	1	1
DmW_111	58	37	4
KM20	47	7	0
LBAE C10	149	68	0
LBAE C11	175	24	0
LBAE E16	90	32	4

(a)



(b)

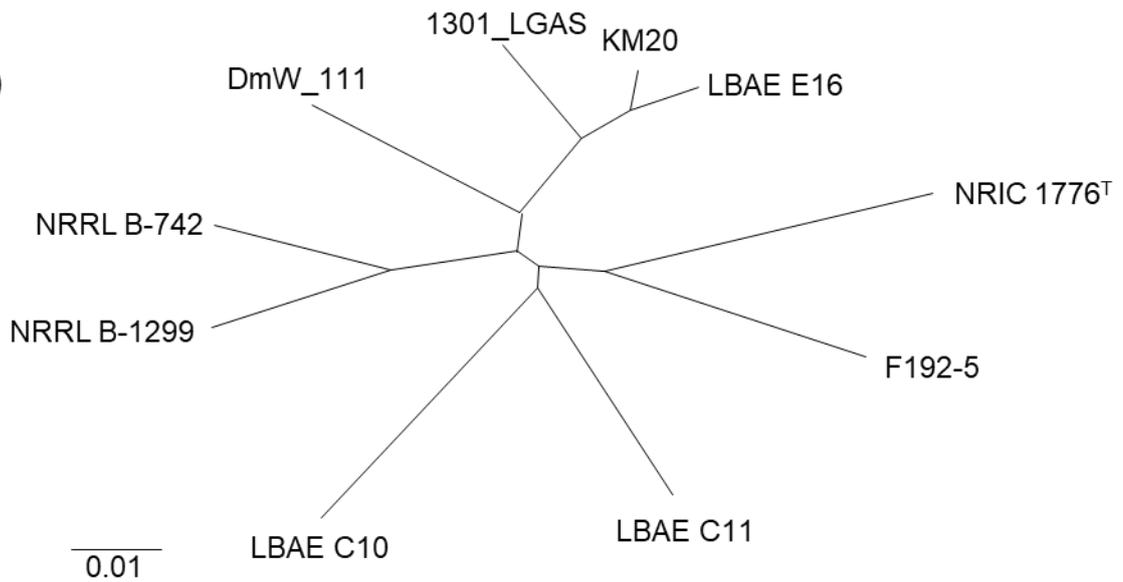


Fig. 26 *Leuc. citreum* のコアゲノムを用いた系統樹

1,357 個のコアゲノムを用いて系統樹 (外群なし) (a) 及び、無根系統樹 (b) を作成した。どちらの図も同義である。

第 3 節 F192-5 株の *adhE* 遺伝子に着目した解析

第 2 章で我々は *Fructobacillus* 属がグルコースをほとんど代謝できないというフルクトフィリックな特徴を有しているのは *adhE* の欠損によるものであることを明らかにした。そこで、本節では F192-5 株がフルクトフィリックな特徴を有している原因を明らかにするために、*adhE* に着目した。本節では F192-5 株の *adhE* の保存性をゲノム解析により明らかにし、さらに形質転換など生化学的解析によって F192-5 株の環境適応の様式の一部を明らかにする。

【実験方法】

1. 使用菌株と実験材料

本節では F192-5 株の *adhE* の保存性を明らかにするために前節で用いたほかの *Leuc. citreum* 菌株のゲノムデータを用いる (Table 32)。また、第 2 章第 1 節項目 4 とで用いた *adhE* を組み込んだ pSJE を使用する。本節で使用、または作成された菌株は以下に示した (Table 32)。

Table 32. 本研究での使用菌株

bacterial strain and plasmid	Description
Bacterial strain	
<i>Escherichia coli</i> DH5 α -pSJE- <i>adhE</i> pro ^t 2	pSJE- <i>adhE</i> pro ^t 2 で形質転換された大腸菌
<i>Leuconostoc citreum</i> 31-11	<i>adhE</i> を組み込んだ F192-5
<i>Leuconostoc citreum</i> 2-1	pSJE を組み込んだ F192-5
Plasmid	
pSJE- <i>adhE</i> pro ^t 2	第 2 章 第 2 節で作成
pSJE- <i>adhE</i> pro	pSJE- <i>adhE</i> pro ^t 2 からターミネーターの切除

2. プロモーター配列の予測

遺伝子のプロモーター配列を予測するために Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) searches (https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) を用い、“Type of organism” は “eukaryote” を選択し、遺伝子間の塩基配列をペーストし、予測した (99)。

3. F192-5 株の形質転換

Escherichia coli DH5 α -pSJE-*adhE*pro¹² からプラスミド抽出を第 2 章第 1 節項目 3 と同様に行いった。抽出した DH5 α -pSJE-*adhE*pro¹² から NotI によってターミネーターを取り除き、F192-5 株の形質転換に用いた。

まず先の *Fructobacillus fructosus* のコンピテントセル作成方法とほぼ同様にして、F192-5 株 のコンピテントセルを作成した。-80°C に保存してある菌体を 5 mL GYP 培地にて、30°C で 24 時間振とう培養 (120 rpm) を行った。その培養液を 200 mL の 0.5 M Sucrose、1.0% glycine 添加 MRS 培地に移した。菌体濁度 OD (660 nm) が 0.2 に到達したところで、0.375 μ g/mL となるように penicillin G を添加した。OD が 0.6 に達したところで、菌体を無菌低温下で回収したのち、等量の MilliQ 水で洗浄し、5 mL の 40 μ g/ml Lysozyme 添加 EPS で懸濁し、37°C で 30 分間インキュベーションを行った。その後、5 mL の EPS で 2 回洗浄を行い、200 μ L の EPS で懸濁し、50 μ L ずつ分注したものをコンピテントセルとした。液体窒素で急速凍結し、-80°C で保存した。

次にエレクトロポレーションを行った。2 mm 氷冷キュベットにコンピテントセルを入れ、DNA を 5 μ g 以下となるように入れた。その後、電極にセットし、1.5 kV、25 μ F、200 Ω のパルスを 5 秒間流した。回復培養として、30°C の 1 mL の 0.5M Sucrose、0.1 M の MgCl₂、1 % Sodium pyruvate 添加 MRS を優しくキュベットに注ぎ、3 時間回復培養を行った。2 μ g/mL Erythromycin 添加 MRS 寒天

培地に平板塗抹し、コロニーが出てくるまでの 3 日間 30°C で培養を行った。

4. F192-5 株の形質転換株の確認

第 2 章第 1 節項目 6 と同様にプラスミド抽出および、PCR により確認を行った。評価のためのプライマーは Table 28 に示した。*adhE* の確認は Table 13 に表記したプライマーを用いて確認を行った。

Table 33. 本研究で使用したプライマー

Primer	Sequence (5'→3')	Purpose
<i>adhE</i> -R100	ATCAATACCTCAGTCATCTTC	プロモーター領域のシーケンス
pLPD4-1t	ATTACAAAGGGTTTAAGCAG	プロモーター領域のシーケンス
F192-5- <i>adhE</i> -EXP-F	TCACAGAACGCCAAGAAGCA	<i>L. citreum</i> の <i>adhE</i> の増幅
F192-5- <i>adhE</i> -EXP-R	CATGATCCGGTACCAAGCGT	<i>L. citreum</i> の <i>adhE</i> の増幅
Lcit_ <i>glk</i> _F	TTAGACAACGATGCGAATGC	<i>glk</i> の増幅
Lcit_ <i>glk</i> _R	TCTTGTGCCAAGCGTACAAC	<i>glk</i> の増幅

5. RNA を抽出し逆転写による遺伝子の発現解析

第 2 章第 1 節項目 7 と同様に RNA 抽出を行い、逆転写後 PCR により発現の有無を確認した。

6. 形質転換株の生育特性の評価

第 2 章第 2 節項目 3 及び 4 と同様にグルコースを糖源とした培地での生育度を評価し、代謝産物を測定した。代謝産物測定のための希釈倍率は以下に示す。

Table 34. 代謝産物試験のための希釈倍率

	F192-5	31-11	2-1	NRIC 1776 ^T
Glucose	100 倍希釈液	原液	100 倍希釈液	原液
Lactate	100 倍希釈液	100 倍希釈液	100 倍希釈液	100 倍希釈液
Ethanol	原液	100 倍希釈液	原液	100 倍希釈液
Acetate	100 倍希釈液	原液	100 倍希釈液	原液

【結果と考察】

まず、F192-5 株のゲノムデータより *adhE* を探索した。F192-5 株の *adhE* 遺伝子は 2,703 bp で、Aldh ドメイン及び Adh ドメインが保存された完全な *adhE* 遺伝子を有していた。ほかの *Leuc. citreum* も 2,703 bp の *adhE* を保持していた。まず、Aldh と Adh の酵素活性を F192-5 株が有しているのか確認したところ、基準株の NRIC 1776^T 株は 214 mU/mg protein の Adh 活性と 4 mU/mg protein の Aldh 活性を有していたのに対し、F192-5 株は Adh 活性も Aldh 活性も有していなかった (Table 35)。酵素活性を有していないのは遺伝子が発現していないためであると考えられたので、F192-5 株は *adhE* を発現させていないことが考えられたので、RNA 抽出し、逆転写し PCR により F192-5 株の *adhE* の発現を解析した。その結果、F192-5 株から得られた genome DNA (gDNA) を鋳型として PCR により増幅すると *adhE* を増幅することができたが、RNA を逆転写して得られた complementary DNA (cDNA) を鋳型にした場合には *adhE* を増幅できなかった (Fig. 27)。このことから、F192-5 株は *adhE* を発現していないことが示された。

Table 35. F192-5 株の Adh/Aldh 活性測定

Strain	Adh	Aldh	NADH oxidase
NRIC 1776 ^T	214	4	60
F192-5	0	0	11,793

(mU mg protein⁻¹)

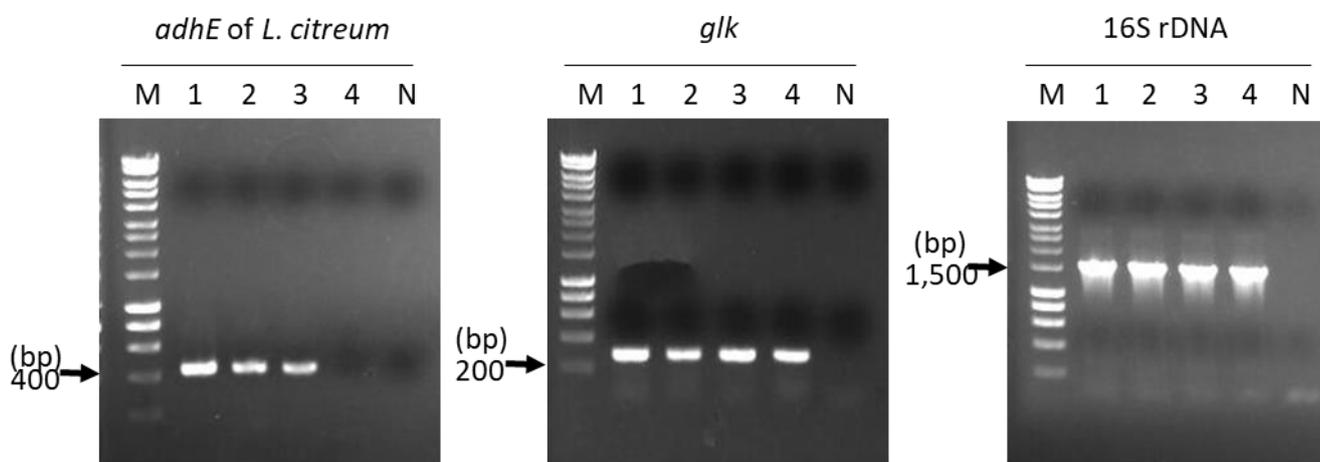


Fig. 27 F192-5 株と NRIC 1776^T 株の *adhE* の遺伝子発現解析

M, Hyper ladder 1 kb (Bioline, London, UK); 1, NRIC 1776^T の gDNA; 2, NRIC 1776^T の cDNA; 3, F192-5 の gDNA; 4, F192-5 の cDNA; N, Negative control.

次に、*adhE* を発現できない理由を明らかにするために F192-5 株とほかの *Leuc. citreum* 菌株の *adhE* の上流に着目して、解析を行った。*Leuc. citreum* の *adhE* は 220 アミノ酸残基 (AA) から 294 AA からなる Glycerophoryl diester phosphodiesterase coding gene と、791 AA からなる Uncharacterized protein coding gene か 463 AA から 532 AA からなる Membrane protein coding gene に挟まれた位置に座している (Fig. 25)。*adhE* と上流遺伝子 Glycerophoryl diester phosphodiesterase coding gene の間に着目して解析したところ、F192-5 株はたった 62 bp しかないのに対し、ほかの *Leuc. citreum* は 229 bp から 230 bp あり、F192-5 株はほかの菌株に比べて極端に短くなっていた (Fig. 26)。この領域の配列を基にプロモーター予測を行ったところ、ほかの *Leuc. citreum* 菌株では promoter score が 0.99 から 1 を示す領域が見出されたものの、F192-5 株は promoter score 0.8 以上の配列を見出すことはできなかった。この結果から、F192-5 株は *adhE* のプロモーターを欠落させることで、遺伝子を不活性化させ、フルクトフィリックな特徴を有していることが考えられた。

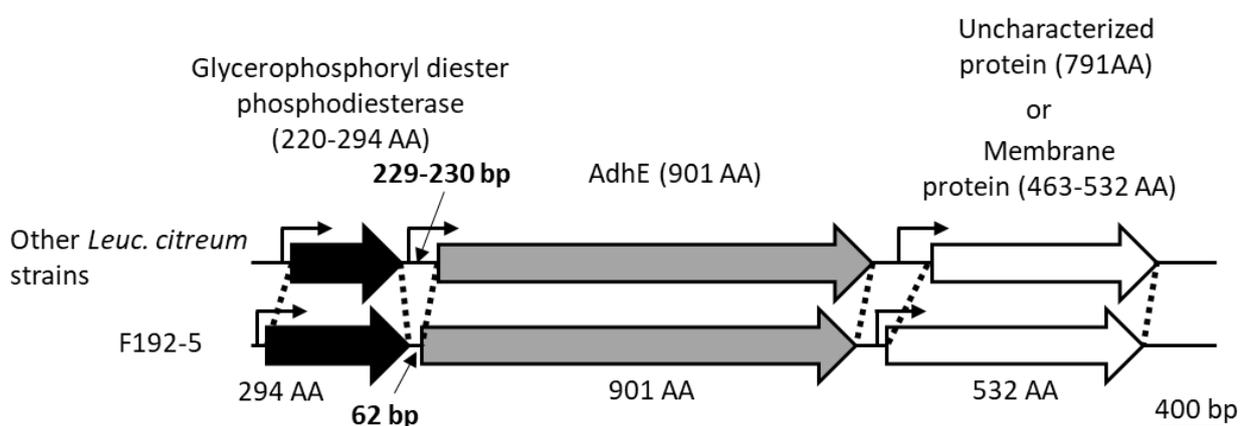


Fig. 28. F192-5 株と他の *Leuc. citreum* の *adhE* の上流から下流遺伝子の遺伝子座の比較

```

1
DmW_11 AAACCTACCTTTTAATGGGCAGGTTTTTTTAGCCTTTTCCTGCAATAAAAAGGGCTATTT
NRIC 1776T AAACCTACCTTTTAATGGGCAGGTTTTTTTAGCCTTTTCCTGCAATAAAAAGGGCTATTT
LBAE C11 AAACCTACCTTTTAATGGGCAGGTTTTTTTAGCCTTTTCCTGCAATAAAAAGGGGCTATTT
NRRL B-B742 AAACCTACCTTTTAATGGGCAGGTTTTTTTAGCTGTTTCCTGCAATAAAAAGGAGCCATTT
NRRL B-1299 AAACCTACCTTTTAATGGGCAGGTTTTTTTAGCTGTTTCCTGCAATAAAAAGGAGCCATTT
LBAE E16 AAACCTACCTTTTAATGGGCAGGTTTTTTTAGCTGTTTCCTGCAATAAAAAGGAGCCATTT
LBAE C10 AAACCTACCTTTTAATGGGCAGGTTTTTTTAGCTGTTTCCTGCAATAAAAAGGAGCCATTT
KM20 AAACCTACCTTTTAATGGGCAGGTTTTTTTAGCTGTTTCCTGCAATAAAAAGGAGCCATTT
1300_LGAS AAACCTACCTTTTAATGGGCAGGTTTTTTTAGCTGTTTCCTGCAATAAAAAGGAGCCATTT
F192-5 AAACCTACCTTTTAATGGGCAGGTTTTTTTAGCTGTTTCCTGCAATAAAAAGGAGC-----
*****

61
DmW_11 CCTTCATATTGTTTATTAATGCACAATTAATCACTTATTATAAAAAGCGCTTACAAAACGC
NRIC 1776T CCTTCATATTGTTTATTAATGCACAATTAATCACTTATTATAAAAAGCGCTTACAAAACGC
LBAE C11 CCTTCATATTGTTTATTAATGCACAATTAATCACTTATTATAAAAAGCGCTTACAAAACGC
NRRL B-B742 CCTTCATATTGTTTATTAATGCACAATTAATCACTTATTATAAAAAGCGCTTACAAAACGC
NRRL B-1299 CCTTCATATTGTTTATTAATGCACAATTAATCACTTATTATAAAAAGCGCTTACAAAACGC
LBAE E16 CCTTCATATTGTTTATTAATGCACAATTAATCACTTATTATAAAAAGCGCTTACAAAACGC
LBAE C10 CCTTCATATTGTTTATTAATGCACAATTAATCACTTATTATAAAAAGCGCTTACAAAACGC
KM20 CCTTCATATTGTTTATTAATGCACAATTAATCACTTATTATAAAAAGCGCTTACAAAACGC
1300_LGAS CCTTCATATTGTTTATTAATGCACAATTAATCACTTATTATAAAAAGCGCTTACAAAACGC
F192-5 -----

121
DmW_11 TTTATATAAGCTATTTAAGATAAATGAATAAAAAAACTTGCTTTTTTTTAAAGGGGTGTTAT
NRIC 1776T TTTATATAAGCTATTTAAGATAAATGAATAAAAAAACTTGCTTTTTTTTAAAGGGGTGTTAT
LBAE C11 TTTATATAAGCTATTTAAGATAAATGAATAAAAAAACTTGCTTTTTTTTCAAAGGGGTGTTAT
NRRL B-B742 TTTATATAAGCTATTTAAGATAAATAAATAAAAAAACTTGCTTTTTTTTCAAAGGGGTGTTAT
NRRL B-1299 TTTATATAAGCTATTTAAGATAAATAAATAAAAAAACTTGCTTTTTTTTCAAAGGGGTGTTAT
LBAE E16 TTTATATAAGCTATTTAAGATAAATAAATAAAAAAACTTGCTTTTTTTTCAAAGGGGTGTTAT
LBAE C10 TTTATATAAGCTATTTAAGATAAATAAATAAAAAAACTTGCTTTTTTTTCAAAGGGGTGTTAT
KM20 TTTATATAAGCTATTTAAGATAAATAAATAAAAAAACTTGCTTTTTTTTCAAAGGGGTGTTAT
1300_LGAS TTTATATAAGCTATTTAAGATAAATAAATAAAAAAACTTGCTTTTTTTTCAAAGGGGTGTTAT
F192-5 -----

181
DmW_11 ATACTTATATTGTTAAGAAATGA-GCAAACGATAAAAAGGAGCATTAAATT
NRIC 1776T ATACTTATATTGTTAAGAAATGA-GCAAACGATAAAAAGGAGCATTAAATT
LBAE C11 ATACTTATATTGTTAAGAAATGA-GCAAACGATAAAAAGGAGCATTAAATT
NRRL B-B742 ATACTTATATTGTTAAGAAATGA-GCAAACGATAAAAAGGAGCATTAAATT
NRRL B-1299 ATACTTATATTGTTAAGAAATGATGCAAACGATAAAAAGGAGCATTAAATT
LBAE E16 ATACTTATATTGTTAAGAAATGA-GCAAACGATAAAAAGGAGCATTAAATT
LBAE C10 TACTTATATTGTTAAGAAATGA-GCAAACGATAAAAAGGAGCATTAAATT
KM20 ATACTTATATTGTTAAGAAATGA-GCAAACGATAAAAAGGAGCATTAAATT
1300_LGAS ATACTTATATTGTTAAGAAATGA-GCAAACGATAAAAAGGAGCATTAAATT
F192-5 -----ATTAATT
*****

```

Fig. 29. *adhE* と Glycerophosphoryl diesterase coding gene の間の塩基配列

F192-5 株はこのプロモーター領域の欠落により、*adhE* が不活性化しているためフルクトフィリックな特徴を有していることが考えられた。そこで、F192-5 株を *adhE* で形質転換するために、第 2 章で作成した *Leuconostoc mesenteroides* 由来の *adhE* が組み込まれた pSJE::*adhE*:::*PslpA*¹2 から NotI にてプロモーター上に組み込まれたターミネーターを取り除き、セルフライゲーションさせたプラスミドを調整した。それを作成した F192-5 株のコンピテントセルにエレクトロポレーション法で形質転換したところ、2 µg/mL Erythromycin 添加 MRS 寒天培地に 2.0×10^1 CFU/µg DNA の形質転換効率でコロニーが得られた。*Leuc. citreum* の *adhE* の発現解析に用いたプライマーを使って PCR をかけたところ、*Leuc. citreum* であることを確認した。ここから、プラスミド抽出及び形質転換したプラスミドの一部を PCR により増幅させ、形質転換を確認し、pSJE::*adhE*:::*PslpA* を形質転換させた F192-5 株を得られたことを確認できた。今後は作成した形質転換株を 31-11 株とする。また、F192-5 株に pSJE のみを形質転換したものを 2-1 株とし、比較対象として用いた。31-11 株に組み込まれたプラスミドのプロモーター領域をシークエンスによって確認したところ *adhE* は *Leuc. mesenteroides* と 100% の相同性を示した。しかし、プラスミドの *adhE* の上流に組み込まれている 2 つのプロモーターのうち Fig. 30 にて黒色矢印で示した箇所にある -35 ボックス部分に 1 塩基変異が入っており (Fig. 30) 、プロモーターとして機能しないことが考えられた。先に述べたように、大腸菌にとって *adhE* は毒性を示すことが報告されているが (78, 87) 、*Leuc. citreum* にとっても過剰な *adhE* は毒性を示すと考えられ、31-11 株はプラスミド上に 2 つあるプロモーター領域の一つに変異を入れることで、遺伝子発現量を調節していたことが考えられた。

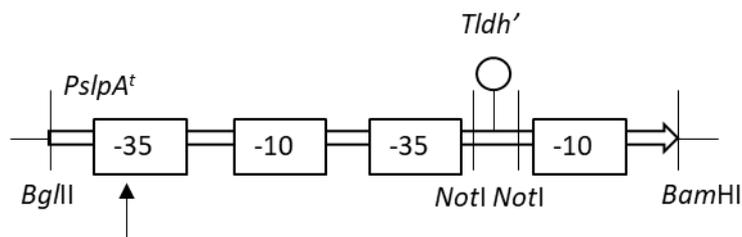


Fig. 30. pSJE::adhE::PslpA のプロモーター領域の変異

まず、得られた 31-11 株内で *Leuc. mesenteroides* 由来の *adhE* が発現しているかどうかの確認を行い、Aldh/Adh 活性を測定した。その結果 F192-5 株及び空ベクターを導入した 2-1 株はもともと保持している *adhE* を発現していなかったが、31-11 株はもともと保持している *adhE* はやはり発現していないものの、導入された *Leuc. mesenteroides* 由来の *adhE* を発現させていることが分かった (Fig. 31)。また、各菌株の細胞内酵素の粗抽出液を作成し酵素活性試験を行ったところ、F192-5 株及び 2-1 株は Adh 活性と Aldh 活性を有していないが、31-11 株はどちらの酵素活性も有していた (Table 36)。これらの結果から、31-11 株の *adhE* 上流のプロモーター領域は片方に変異が入っているが、31-11 株内で外来性の *adhE* を発現させ、その酵素活性を有していることが確認された。そこで、グルコースを糖源とする GYP 培地において親株と 2-1 株および、31-11 株の生育を確認したところ、親株及び 2-1 株はほとんど生育しなかったが、31-11 株のみ良好な生育を見せた (Fig. 31)。さらに、親株と 2-1 株はグルコースを代謝した際の主要な最終産物は酢酸であり、乳酸と等モル生産していたが、31-11 株は一般的な乳酸菌のグルコースのヘテロ発酵と同様に、酢酸ではなくエタノールを主に生産するようになった (Table 37)。このことから、F192-5 株はプロモーターを欠落させることで *adhE* を不活性化させ、グルコースをほとんど代謝できないというフルクトフィリック様の特徴を有していることが明らかとなった。

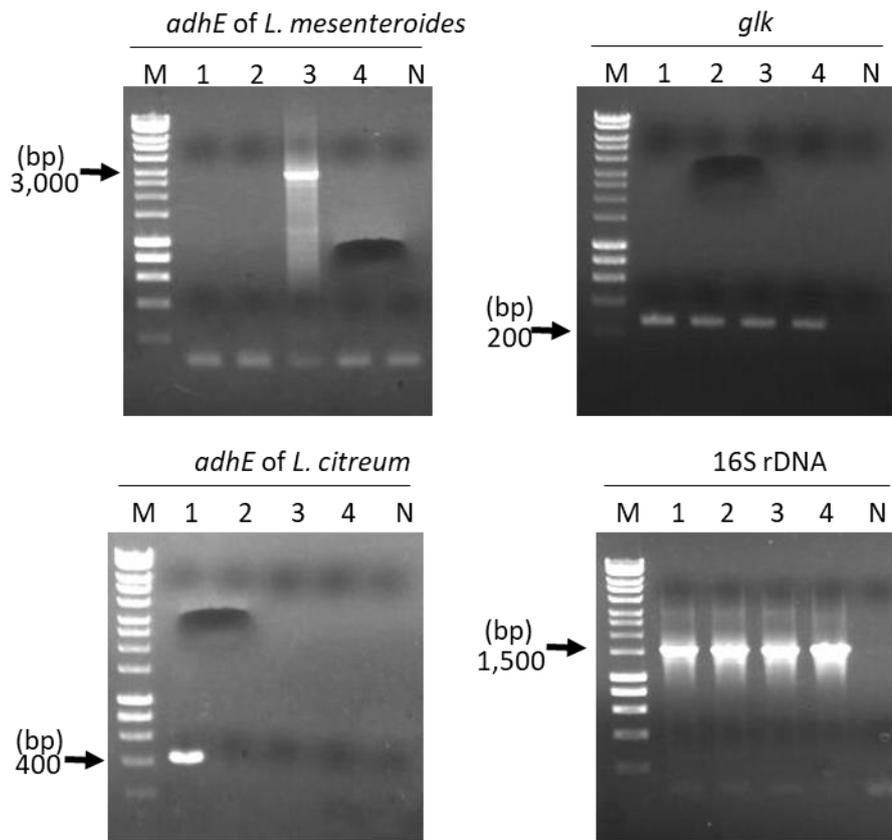


Fig. 31. F192-5 株、31-11 株、2-1 株の *adhE*、*glk*、16S rRNA 遺伝子の発現解析
 Lanes M, Hyper ladder 1 kb (Bioline, London, UK); 1, NRIC 1776^T 株の gDNA; 2, F192-5 株の cDNA; 3, 31-11 株の gDNA; 4, 2-1 株の gDNA; N, Negative control.

Table 36. ADH/ALDH、NADH oxidase の酵素活性

菌株	Adh	Aldh	NADH oxidase
NRIC 1776 ^T	214	4	60
F192-5	0	0	11,793
31-11	468	3	496
2-1	0	0	1,285

(mU mg protein⁻¹)

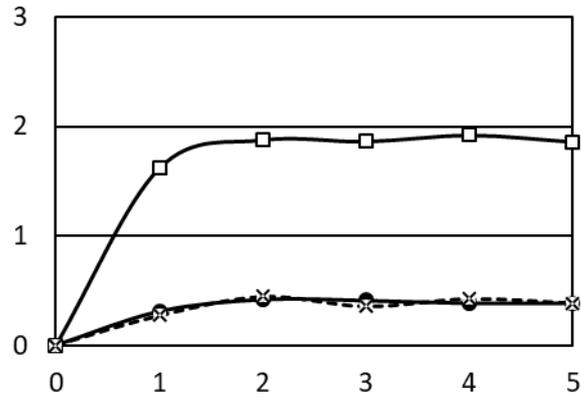


Fig. 32. GYP における *L. citreum* F192-5 (●), 31-11 (□) and 2-1 (×) の生育曲線

Table 37. グルコースからの最終産物

菌株	消費 グルコース (mM)	最終産物 (mM)			L:E:A	対糖収率 (%)
		乳酸 (L)	エタノール (E)	酢酸 (A)		
NRIC 1776 ^T	51.3	56.3	47.8	1.9	1:0.9:0.0	87.2
F192-5	13.9	14.6	0.2	14.1	1:0.0:1.0	86.7
31-11	53.9	58.3	71.8	1.2	1:1.2:0.0	99.3
2-1	9.6	10.3	0.3	12.5	1:0.0:1.2	98.2

第 4 節 要約

第三章では FLAB の生態学的研究の過程でミカンの皮より分離された、特異な *Leuc. citreum* 菌株の表現性状とゲノムの特徴を明らかにした。*Leuc. citreum* は漬物などの植物環境や動物消化管などに広く生息する一般的な乳酸菌である一方で、ミカンの皮から分離された F192-5 株は *Leuc. citreum* に分類されながら、グルコースを生育基質とした培地ではほとんど生育せず、電子受容体存在下で良好な生育を見せるというフルクトフィリック様の特徴を示す。F192-5 株のように菌株特異的にフルクトフィリックな特徴を有する乳酸菌の報告はこれまでにない。まず、F192-5 株とほかの *Leuc. citreum* 菌株の比較ゲノム解析を行った結果、F192-5 株のゲノムサイズはほかの *Leuc. citreum* 菌株と同程度の大きさで、*Fructobacillus* 属や *L. kunkeei* にみられた糖代謝関連遺伝子の特異的な欠落が F192-5 株には見られなかった。このため、F192-5 株は先の FLAB とは完全に異なる環境適応を行ってきたことが明らかになった。次にフルクトフィリックな特徴を決定づける *adhE* に着目して解析を行ったところ、F192-5 株は完全長の *adhE* を保持しているが、この遺伝子は発現しておらず、F192-5 株は Aldh および Adh 活性を有していなかった。そこでゲノム上の *adhE* の周辺配列を詳細に解析したところ、ほかの *Leuc. citreum* 菌株で見られた *adhE* 上流のプロモーター領域を F192-5 株では見出すことができず、そのためグルコースを代謝できないことが予想された。そこで、F192-5 株を近縁菌種由来の *adhE* で形質転換したところ、形質転換株はグルコースを糖源とする培地で良好な生育を示した。このことから、F192-5 株は *adhE* が不活性化することで、フルクトフィリック様の特徴を有していることが明らかとなった。このように先の FLAB に見られた代謝系をシンプルにし、*adhE* を欠損させるという進化ではなく、ほかの代謝系は欠落させず、*adhE* を不活性化することのみでフルクトフィリック様の特徴を有している F192-5 株のような乳

酸菌を「シュードフルクトフィリック乳酸菌」と名付けた。乳酸菌には菌株特異的にフルクトフィリック様の特徴を有している菌株が存在していることが明らかになった。これは乳酸菌が菌種内で多様性を持つという生残戦略の一つである可能性が考えられる。

本章にある内容は “Pseudofructophilic *Leuconostoc citreum* Strain F192-5, Isolated from Satsuma Mandarin Peel” というタイトルで *Applied and Environmental Microbiology* に 2019 年に発表した。

第 4 章 *Lactobacillus kunkeei* FF30-6 株が生産するバクテリオシン kunkecin A の構造と特徴解析

序

ミツバチは植物の受粉を行う花粉媒介昆虫として知られており、作物生産のために非常に重要な昆虫である。農業経済学的においては、ミツバチが行う受粉は世界の約 10% をしめており (40)、ミツバチが主要な花粉媒介昆虫であることが示されている。しかし、ミツバチは近年、減少の一途をたどっており (100)、それはハチ群崩壊症候群 (Colony collapse disorder; CCD) によるものであると考えられている (101)。この現象には生息地の減少 (102)、地球温暖化 (103)、農薬の散布 (104)、ダニなどの寄生虫 (105) など様々な要因が考えられており、病原性細菌の存在はこれら主要な減少理由の一つとして考えられている。病原性細菌による主な病気として *Melissococcus plutonius* によるヨーロッパ腐蛆病 (European foulbrood; EFB) と (106)、*Paenibacillus larvae* によるアメリカ腐蛆病 (American foulbrood; AFB) が知られている (107)。これら腐蛆病は病原菌が芽胞を形成するか、否かの差はあるが、いずれも幼虫が病原性菌を含む餌を接種することで感染し、幼虫が発症後には死亡してしまうという特徴を有している (107, 108)。この腐蛆病は法定伝染病として養蜂家を悩ませており、その対抗策として抗生剤である「ミツバチ用アピテン」(ミロサマイシン) が動物用医薬品として日本では承認されている。この抗生剤はあくまで予防策であり、抗生物質による *M. plutonius* の予防は一時的であると言われている。また、ミツバチの副産物である蜂蜜への抗生剤残留や抗生物質に耐性を示す抗生物質耐性菌の出現が懸念されており、抗生物質の代替品の発見が求められている。

乳酸菌が生産するバクテリオシンはリボソーム上で合成れる抗菌ペプチドで、

熱や酸に対して高い安定性を有しており、また低濃度でも強い抗菌活性を有しているという特徴を持っている。さらにタンパク質分解酵素により容易に分解されることから、耐性菌の出現の可能性が極めて低いと考えられている。バクテリオシンはアミノ酸組成、分子量、作用機構、分泌機構、抗菌スペクトルなどを指標として、5つのクラスに分類される (109)。異常アミノ酸を含む Class I、分子量が 5 kDa 以下の以上アミノ酸を含まない Class II、30 kDa 以上の Class III、複数のユニットからなる Class IV、環状バクテリオシンの Class V からなる (110)。最も有名な乳酸菌バクテリオシンの 1 つとして *Lactococcus lactis* NCDO 497 株が生産する nisin A (ナイシン) が知られている。これは世界 50 カ国以上で食品への添加が認められており、日本でも 2009 年 3 月 2 日に厚生労働省医薬食品局食品安全部長による「食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について」(<http://www.jhnfa.org/tokuhou51.pdf>) によって食品添加物として認可されている。

我々は FLAB の生態学的研究の過程で *Lactobacillus kunkeei* FF30-6 株がバクテリオシン様物質を生産することを見出した。この FF30-6 株が生産するバクテリオシン様物質はヨーロッパ腐蝕病である *M. plutonius* に対して特異的に抗菌活性を示す可能性が示唆された。そこで本章では、FF30-6 株が生産するバクテリオシン様物質の遺伝子候補群をゲノムデータより見出し、このバクテリオシン様遺伝子の諸特性の解析を目的とした。

第 1 節 *Lactobacillus kunkeei* FF30-6 株のゲノムデータからバクテリオシン関連遺伝子の探索

バクテリオシン関連遺伝子は一般的にプラスミド上にコードされている場合が多く、染色体にコードされていることは少ない。プラスミドは細菌細胞内に複数コピー存在していることが多いことから、プラスミドのシーケンスカバレッジはクロモソームの部分と比較して高い値を示すことが多いと考えられている。この特性を利用して、本節では *L. kunkeei* FF30-6 株のゲノムデータからバクテリオシン生産関連遺伝子の探索を行うことを目的に、FF30-6 株のドラフトゲノム決定時のシーケンスリードのカバレッジを求めプラスミドを探索する。その結果を基にバクテリオシン関連遺伝子をコードするバクテリオシンの探索及びその配列の決定を行った。また、九州大学農学研究院生命機能科学部門助教 善藤 威史 先生のチームに当該バクテリオシンの精製を依頼した。

【実験方法】

1. *Lactobacillus kunkeei* FF30-6 株のシーケンスカバレッジによるプラスミドの探索

本研究第 1 章に決定した 25 個のコンティグからなる *L. kunkeei* FF30-6 株のドラフトゲノムデータ (Accession number: NZ_BDDX00000000) を用いた (93)。まず、ドラフトゲノムのシーケンスカバレッジを求めるため、ショートリードをマッピングするための Burrows-Wheeler Aligner (bwa) (version 0.7.12) (111) と、それによりできた sam ファイルを bam ファイルへとフォーマットを変化させる samtools (version 1.2) (112) を用いた。自作のスクリプトにてこれらのプログラムを実行した。また、*L. kunkeei* FF30-6 株のゲノムデータからバクテリオシン関連

遺伝子を探索した。

得られたプラスミド情報からプライマーを作成し (FF306-c12-F, 5'-AAAAGAATAGACAACCACCCA-3'; FF306-c12-R, 5'-CCTTTCTAAGAGGAATA-TGG-3')、プラスミドの完全長配列の決定を行った。PCR の条件は 94°C で 5 分間予備的な熱変性を行い、94°C で 30 秒間の熱変性、55°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 45 秒間の伸長反応を 35 サイクル行い、72°C で 7 分間完全に伸長させた後 4°C で保存した。1% アガロースゲル電気泳動にて増幅を確認後、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) を用いた、サイクルシーケンス法により 19,498 bp からなるプラスミド pKUNFF30-6 の配列を決定した。

2. BLASTP によるバクテリオシン関連遺伝子の探索

決定したプラスミドを微生物ゲノムアノテーションパイプライン MiGAP (Microbial Genome Annotation Pipeline) によりアノテーションを行い (MiGAP はマルコフモデルを用いた GLIMMER を用いたパイプラインであったが (113)、(GLIMMER は 2019 年 2 月にサービスを終了している。)) 18 個の遺伝子を決定した。Nisin A 生産菌である *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56 株のゲノムデータ (Accession number: CP002365.1) を参考にして、BLASTP 解析を行い、バクテリオシン生産関連遺伝子の探索を行った。

3. pKUNFF30-6 のゲノムの登録

pKUNFF30-6 のシーケンスデータは DDBJ/EMBL/GenBank International Nucleotide Sequence Database に登録した。アクセッション番号は AP019008 である。

【結果と考察】

第 1 章の研究により、*L. kunkeei* FF30-6 株の 25 個のコンティグからなるドラフトゲノムを決定した。まず、プラスミドをコードしているコンティグを推定するために、ドラフトゲノムのシーケンスカバレッジを計算した (Fig. 33)。多くのコンティグのカバレッジは 4 程度であるのに対し、コンティグ 7、17、20、23、24 はカバレッジが 10 を超える大きなものであった。そこで、それらのコンティグを詳細に解析したところコンティグ 7、23、24 は transposon と推測され、コンティグ 20 は ribosomal RNA 遺伝子が多くコードされていた。また、コンティグ 17 は replication initiator protein がコードされていたことから、プラスミドであることが推測されたが、バクテリオシン様遺伝子は確認できなかった (Fig. 33)。そこで、FF30-6 株のゲノムデータを再び詳細に解析したところ、コンティグ 12 にバクテリオシンである nisin A 様の遺伝子がコードされており、その周辺には replication initiator protein がコードされていることからこのコンティグがプラスミドであることが推測された (Table 38)。このコンティグはサンガー法により、塩基配列を決定し 19,498 bp からなる環状プラスミド pKUNFF30-6 を見出した。pKUNFF30-6 上にコードされている nisin A 様バクテリオシンのアミノ酸配列と nisin A のアミノ酸配列を比較したところ 54.8% の相同性を有していた (Fig. 34)。次に、BLASTP 解析により pKUNFF30-6 にコードされているバクテリオシン生産関連遺伝子の推定を行った。まず、MiGAP によりアノテーションを行ったところ、プラスミド上には 18 個の遺伝子が予測された (Table 38)。Table 39 にはすでに NCBI に登録されてある FF30-6 株のゲノムデータと pKUNFF30-6 株の登録した遺伝子データの LOCUS_tag の一覧を示しており、隣り合う LOCUS_tag は同じ遺伝子の情報を示している。Nisin A はこれまでの研究により、生合成経路が明らかにされている (114)。発現・翻訳されたバクテリオシン本体

とリーダーペプチドは NisB により脱水、NisC により環化され、NisT を利用して菌体外に排出される。NisP によりリーダーペプチドを切断後に NisA は成熟型 nisinA として抗菌活性を持つ。自己耐性タンパクとして NisEFG 及び NisI が知られており、nisinA は NisK 及び NisR によって生産制御されている (115)。

pKUNFF30-6 上に nisin A と同様の生産関連遺伝子がコードされているのか、18 個の遺伝子をすべてマニュアルで BLASTP 解析を行ったところ 8 個のバクテリオシン生産関連遺伝子を推定した (Table 35, Fig. 32)。しかし、nisinA の生産 k 株にみられる自己耐性に関わる膜タンパク質である NisI、nisinA の生産制御に関わる NisR、NisK に相当するタンパク質をコードする遺伝子を見出すことはできず、FF30-6 株はこれら 3 つのタンパク質を使わずにバクテリオシンを生産していることが示唆された。バクテリオシン生産関連遺伝子とみられる 8 個の遺伝子は、*nisPACT* に相当するクラスターと *nisEFGB* に相当するクラスターが背中合わせに 1 つの遺伝子クラスターとしてコードされていることを見出した (Fig. 35, 36)。

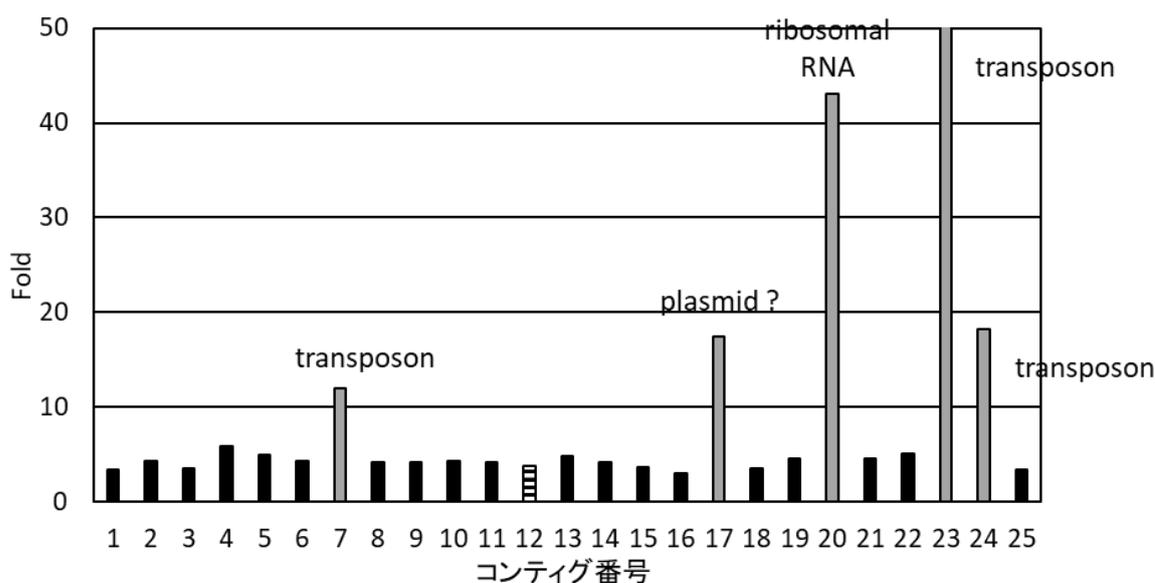


Fig. 33. FF30-6 株のシーケンスカバレッジ

		リーダーペプチド	
nisinA	1	-MSTKDFNLDLVSVSKKDSGASPRITSI SLCTPGCITGALMGCNKTATCHC SIHVSK-----	57
kunkecinA	1	MSNFNDFNLGIKKVHSGSKKGLEPRITSYVLCTPGCITGRLMGCNKTATCHCHSSNHFSFHAR	64

Fig. 34. nisin A と FF30-6 株のバクテリオシンのアミノ酸配列の比較

Table 38. pKUNFF30-6 にコードされている遺伝子の概要

LOCUS_tag	MiGAP によるアノテーション	pKUNFF30-6 として公開した product
FF306_p00001	Uncharacterized protein	hypothetical protein
FF306_p00002	resolvase family (DNA invertase-likeprotein)	resolvase
FF306_p00003	hypothetical protein	hypothetical protein
FF306_p00004	hypothetical protein	hypothetical protein
FF306_p00005	hypothetical protein	hypothetical protein
FF306_p00006	hypothetical protein	hypothetical protein
FF306_p00007	Replication initiator protein A	hypothetical protein
FF306_p00008	ATPase involved in chromosome partitioning	replication initiator protein A
FF306_p00009	hypothetical protein	hypothetical protein
FF306_p00010	S8A family lantibiotic epidermin serine protease	leader peptidase
FF306_p00011	lantibiotic nisin-A precursor (<i>spaM</i>)	lantibiotic kunkecin A
FF306_p00012	Nisin biosynthesis protein NisC (<i>nisC</i>)	Lactibiotic cyclase KunC
FF306_p00013	multidrug ABC transporter permease protein (<i>mdIB_3</i>)	ABC transporter KunT
FF306_p00014	ABC transporter ATP-binding protein	putative self-immunity protein KunF
FF306_p00015	major facilitator superfamily transporter	putative self-immunity protein KunE
FF306_p00016	ABC-2 family transporter protein	putative self-immunity protein KunG
FF306_p00017	hypothetical protein	lantibiotic dehydratase KunB
FF306_p00018	hypothetical protein	hypothetical protein

Table 39. pKUNFF30-6 と FF30-6 株のゲノムデータ LOCUS_tag

FF30-6	pKUNFF30-6
FF306_01075	FF306_p00001
FF306_01076	FF306_p00002
FF306_01077	FF306_p00003
FF306_01078	FF306_p00004
FF306_01079	FF306_p00005
FF306_01080	FF306_p00006
FF306_01081	FF306_p00007
FF306_01082	FF306_p00008
FF306_01083	FF306_p00009
FF306_01084	FF306_p00010
FF306_01085	FF306_p00011
FF306_01086	FF306_p00012
FF306_01087	FF306_p00013
FF306_01088	FF306_p00014
FF306_01089	FF306_p00015
FF306_01090	FF306_p00016
FF306_01091	FF306_p00017
FF306_01092	FF306_p00018

Table 40. バクテリオシン様抗菌物質生産遺伝子クラスターの探索

LOCUS_tag	BLASTP によるトップヒット	対応する nisinA 生合成遺伝子
FF306_p00010	Peptidase S8 [<i>Bacillus cereus</i>] (235/424 (55%))	NisP
FF306_p00011	Lactibiotic nisin-A [<i>Lactococcus lactis</i>] (32/48(66%))	NisA
FF306_p00012	Subtilin biosynthesis proteinSpaC [<i>Bacillus</i> sp.](216/441(48%))	NisC
FF306_p00013	ABC transporter [<i>Bacillus subtilis</i>](369/583(63%))	NisT
FF306_p00014	Lantibiotic ABC transporter [<i>Lactobacillus apis</i>] (181/223(45%))	NisF
FF306_p00015	ABC type-2 transporter [<i>Lactobacillus bombicola</i>] (136/243(55%))	NisE
FF306_p00016	Lantibiotic ABC transporter [<i>Lactobacillus gasseri</i>] (142/238(59%))	NisG
FF306_p00017	Subtilin biosynthesis protein SpaB [<i>Paenibacillus</i> sp.] (454/1001(45%))	NisB

九州大学助教 善藤 威史 先生に FF30-6 株が生産するバクテリオシンの精製をしていただいた。精製は即位性相互作用クロマトグラフィー (Amberlite-XAD16N)、陽イオン交換クロマトグラフィー (SP-Sepharose fast flow) と 2 回の HPLC により行われ、得られた精製物の分子量は 4,219.08 であった。本バクテリオシンの分子量と、ゲノム解析から推定されたバクテリオシン生産遺伝子から生産されるペプチドの分子量を比較すると、ゲノムデータから推定される分子量の方が 108 程度大きかった。Nisin A は異常アミノ酸を含む Class I に分類されるアミノ酸であり、脱水縮合し、環化構造を有することから (Fig. 33)、30 番目までのアミノ酸配列解析を改めて行っていただいたところ、2, 3, 7, 8, 11, 13, 19, 23, 25, 26, 28 番目のアミノ酸が同定されなかった (Fig. 34)。同定できなかったアミノ酸配列はゲノムデータと比較すると、スレオニン (T) とセリン (S)、及びシステインであることが明らかとなった。セリン及びシステインは脱水して、デヒドロアラニンやデヒドロブチリンとなり、またシステインは硫黄で架橋を形成することで環化し、ランチオニンや 3-メチルランチオニンといった異常アミノ酸を生産する。脱水しうるスレオニン及びセリンが 6 個あることから、ゲノムデータより推測されるバクテリオシン様抗菌物質の分子量は $4,218.87 (= 4,326.99 - 18.02 \times 6 \text{ 分子})$ であると推測され、TOF-MS により得られた分子量と一致した。この結果より、*L. kunkeei* FF30-6 株は異常アミノ酸であるランチオニンを含むバクテリオシン (ランチビオティック) を生産することが明らかとなり、このバクテリオシンを *kunkecin A* と名付けた。

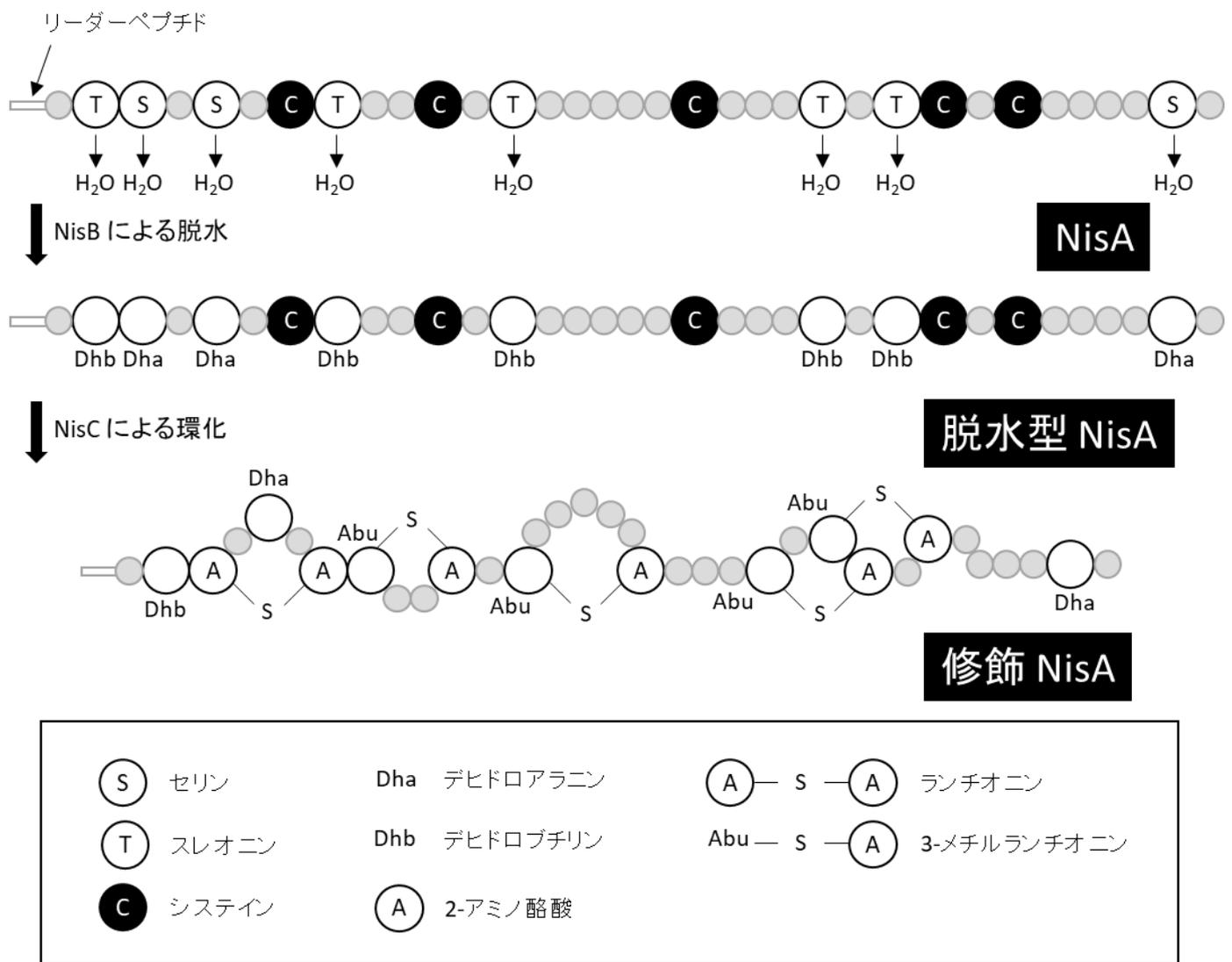


Fig. 33. Nisin A の翻訳後修飾

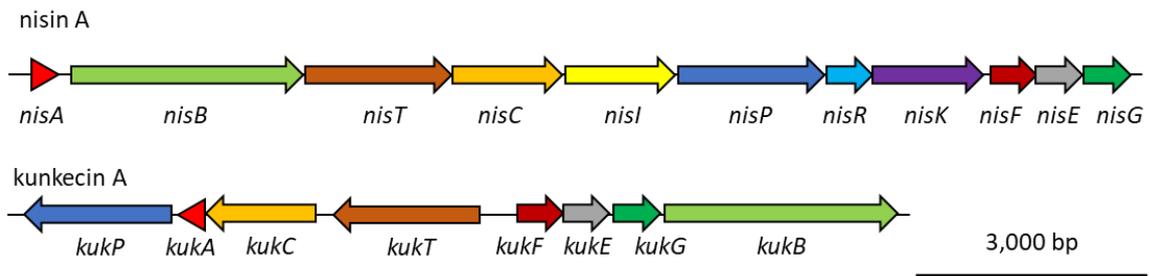


Fig 35. バクテリオシン様抗菌物質生産遺伝子クラスター

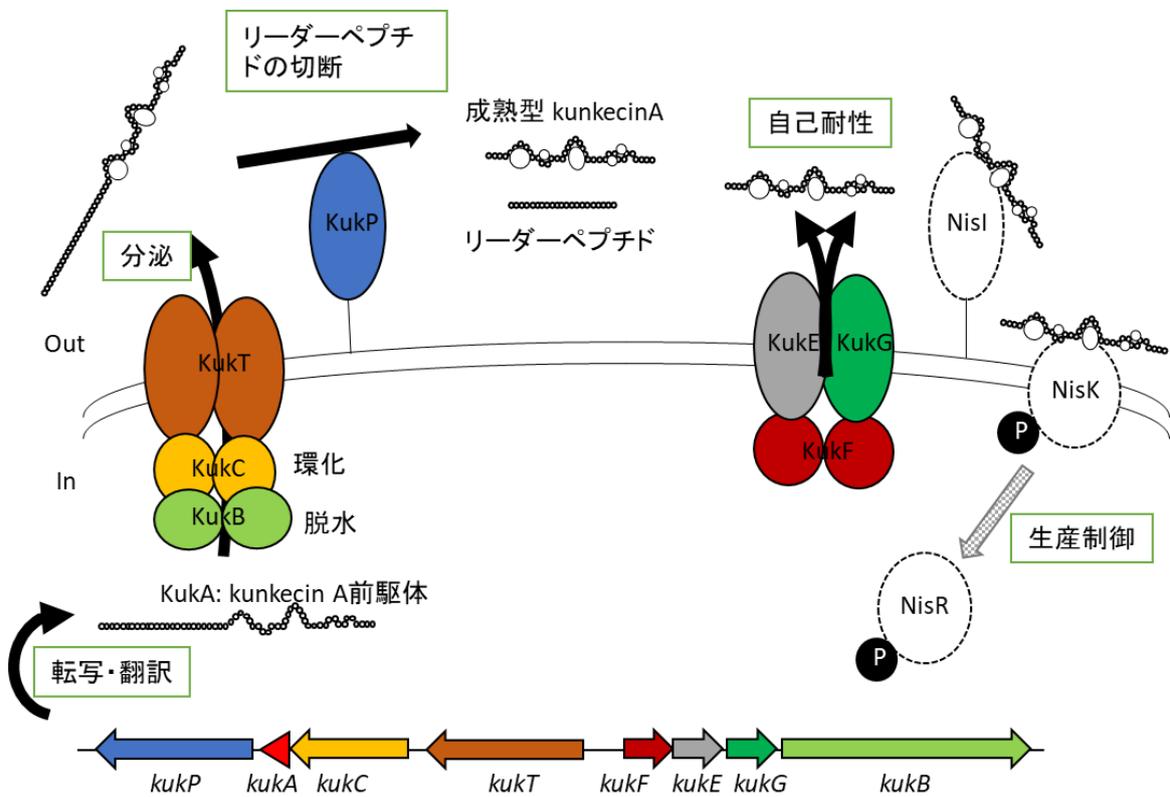


Fig. 36. kunkecin A の生合成経路の予測

第 2 節 kunkecin A の抗菌スペクトルの作成

本節では、精製 kunkecin A 及び nisin A の抗菌スペクトルを比較することで、kunkecin A の養蜂への利用がミツバチ消化管内細菌に対して与える影響を詳細に解析する。また、腐蛆病病原菌 *Melissococcus plutonius* の生育抑制効果を評価する。これにより FLAB がミツバチプロバイオティクスとして利用できる可能性があるか評価を行うことを目的とする。

本節の試験では九州大学助教 善藤 威史 先生によって一般的な細菌に対する精製 kunkecin A の最少活性濃度が決定された。我々はミツバチ消化管内細菌の分離株に対する kunkecin A の最少活性濃度を決定した。

【実験方法】

1. 使用菌株と実験材料

Kunkecin A がミツバチ消化管内細菌の生育に与える影響を推定するためにミツバチ消化管から分離された乳酸菌、ビフィズス菌を用いて実験を行った。使用菌株は以下の Table 36 に示す。精製された kunkecin A および nisin A は -20℃ で保管し。濃度を用事調整して使用した。

Table 41. kunkecin A および nisin A の抗菌活性試験の指標菌

乳酸菌	フルクトフィリック乳酸菌
<p><u>Firm-5</u> <i>L. helsingborgensis</i> JCM 30766^T <i>L. kimbladii</i> JCM 30767^T <i>L. melliventris</i> JCM 30770^T <i>L. apis</i> SH3-5 <i>L. kullabergensis</i> SH3-7</p>	<p><i>Lactobacillus kunkeei</i> FF30-6 <i>Lactobacillus kunkeei</i> JCM 16173 <i>Lactobacillus kunkeei</i> FMO-1 <i>Lactobacillus kunkeei</i> FMO-15 <i>Lactobacillus apinorum</i> JCM 30765^T <i>Fructobacillus fructosus</i> FMO-85</p>
<p><u>Firm-4</u> <i>L. mellifer</i> JCM 30768^T <i>L. mellis</i> JCM 30769^T</p>	
腐蛆病病原菌	ビフィズス菌
<p><i>Melissococcus plutonius</i> ATCC 35311^T <i>Paenibacillus larvae</i> PL-1</p>	<p><i>Bifidobacterium asteroides</i> SH3-1 <i>Bifidobacterium coryniforme</i> SH6-2 <i>Bifidobacterium indicum</i> SH4-4</p>

2. 使用菌株の培養

FLAB は -80°Cのストックから 1 mL の FYP 培地に接種し、30°C で一晚培養した菌液を 1 mL の FYP 培地に 1 白金耳を接種し、約 20 時間培養した菌液を実験に用いた。FLAB 以外のミツバチ消化管内乳酸菌及びビフィズス菌は -80°Cのストックから 1 mL の 1% フルクトース添加 MRS 培地に接種し、37°C で菌の生育に応じて 1 から 2 日間 Bugbox (ruskin) 内で嫌気培養を行い実験に用いた。腐蛆病病原菌 *M. plutonius* ATCC 35311^T は KS-BHI 寒天培地 (2.04% KH₂PO₄; 1% 可溶性デンプン; 3.7% BHI broth (OXOID)) を用いて、*Paenibacillus larvae* は 0.5% 馬脱繊維血添加 GAM 寒天培地を用いて、どちらも 37°C で嫌気培養を行った。*M. plutonius* は 3 から 5 日間培養したものを使用し、*P. larvae* は 2 日間培養を行った。両腐蛆病病原菌株は寒天培地で培養後、0.85% 生理食塩水を用いて集菌し、実験を行った。

3. Kunkecin A および FF30-6 株の培養上清の抗菌活性の測定

抗菌活性は spot-on-lown 法を用いて、測定した。まず前培養した指標菌を、前培養と同じ寒天培地に 100 μ L ずつ平板塗抹した。精製された kunkecin A は適宜濃度を 0.1% Treen80 溶液で希釈し、平板塗抹後の寒天培地に 10 μ L 滴下し、しっかりと乾燥させた後にそれぞれの培養条件に合わせて 1 から 3 日間培養し、結果を評価した。少しでも生育を抑制しているとみられた希釈倍率は、抗菌活性を保持し、それぞれの細菌に対する最少活性濃度を算出した。

L. kunkeei FF30-6 株は -80°C から 1 mL の FYP 液体培地に接種し、30°C で一晩静置培養を行った。培養液を 1 mL の FYP 培地に 1 白金耳分移し、30°C で 18 時間から 22 時間培養を行った。培養された菌液を 8,000 rpm で 5 分間遠心分離し、培養上清を新しいチューブに移した。90°C で 5 分間ヒートブロックにより熱殺菌し、氷中で 5 分以上覚ましたものをサンプルとし、精製バクテリオシンと同様に 10 μ L 滴下した。培養時間は指標菌に合わせて調整を行った。

【結果と考察】

Nisin A と高い相同性を示す kunkecin A の精製が前節で行われた。それを用いて本節では kunkecin A の抗菌活性を nisin A と比較した。本研究に、様々な菌株を用いたところ、菌種によって生育阻止濃度に大きな幅が見られたので、Kunkecin A は生産菌の最小活性濃度である 789 mM 以上の濃度をスポットしても生育した菌株を耐性菌、50 mM 以上かつ 789 mM より低濃度で生育が抑制された菌株を感受性菌、50 mM より低濃度で生育が抑制された菌株を高度感受性菌とした。Nisin A は生産菌の最小活性濃度である 582 mM 以上の濃度をスポットしても生育した菌株を耐性菌、50 mM 以上かつ 582 mM より低濃度で生育が抑制された

菌株を感受性菌、50 mM より低濃度で生育が抑制された菌株を高度感受性菌とした。まず、一般的な細菌に対する抗菌活性を最少活性濃度で示した (Table 42)。本実験の中で、一般的な細菌に対して nisin A は耐性菌がないが、kunkecin A に対しては耐性を持つ菌種が 3 菌種いた。また、50 mM 以下の極めて低濃度で生育が抑制される菌種が nisin A では 6 菌種も見出されたのに対し、kunkecin A ではたった 3 菌種しか見出されなかった。これは、nisin A のほうが kunkecin A よりも抗菌活性が強く、それはアミノ酸残基数を含めた構造による影響であることが考えられる。また、乳酸菌バクテリオシンはグラム陰性菌に対して抗菌活性が低いことは非常によく知られており、*Escherichia coli* に対する kunkecin A の最少活性濃度は 12,652 mM であった。この結果から nisin A に比べ、kunkecin A は抗菌スペクトルが狭いことが示唆された。さらに、nisin A 生産株である *Lc. lactis* NCDO 497 株は精製 kunkecin A に対して高い耐性を示したことから、*Lc. lactis* NCDO 497 株が保持している nisin A に対する自己耐性タンパク質はクロスレジスタンス的に kunkecin A に対する耐性の向上に関連している可能性が考えられた。

ミツバチ消化管内細菌の乳酸菌は Firm-4 *Lactobacillus* 属細菌、*L. acidophilus* に近縁な Firm-5 *Lactobacillus* 属細菌、フルクトフィリック乳酸菌と大きく 3 つのグループに分類される。ここに *Bifidobacterium* 属細菌を加え、ミツバチ消化管内善玉菌に kunkecin A が与える影響を最少活性濃度を決定することにより検討した (Table 43)。15 菌株のミツバチ消化管内善玉菌に対して試験したところ、nisin A に対して耐性菌は 5 菌株、感受性菌は 9 菌株、高度感受性菌は 3 菌株見出された。kunkecin A に対して耐性を持つ菌株は 3 菌株しかおらず、感受性菌は 8 菌株、高度感受性菌は 6 菌株見出された (Table 44)。ヨーロッパ腐蛆病病原菌である *M. plutonius* の nisin A における最少活性濃度は 36 mM であるのに対し、kunkecin A での最少活性濃度はより低い 13mM であった。また、nisin A では

耐性を示した *P. larvae* に対しても kunkecin A では感受性を示した。この結果から、精製 kunkecin A をミツバチ消化管内細菌に作用させた場合、生育阻害される善玉菌がいる可能性が強く示唆された。

その一方で、FF30-6 株の培養上清をミツバチ消化管内細菌にスポットしたところ、菌種によるが精製バクテリオシンの 49 mM から 98 mM 相当の抗菌活性しか有していないことが明らかとなり (Table 45)、15 菌株のミツバチ消化管内善玉菌のうち、5 菌種程度に抗菌活性を示し、ミツバチ消化管内細菌叢に与える影響が少ない可能性が示唆された。養蜂業での利用を考えた場合、精製物を使用することは、法律や条例の問題、コストをはじめとする問題が想定される。一方で、抗生物質などと比較した場合、kunkecin A の使用はミツバチ腸内の有益菌に大きな悪影響を及ぼさない可能性が考えられた。これについては今後さらに検討が必要である。

現在、養蜂業では抗生物質が用いられているが、耐性菌の出現といった大きな問題を抱えている。乳酸菌が生産するバクテリオシンはそれらの問題を解決するために大きな期待がされている。FF30-6 株が生産する kunkecin A は抗菌活性が低いという問題があるが、*M. plutonius* の生育を特異的に阻害し、ミツバチ消化管内細菌叢に大きな影響を与えないことから、ミツバチのプロバイオティクスとしての効果が期待できると考えられる。

Table 42. 精製 kunkecin A の一般的な細菌に対する最少活性濃度 (mM)

	Species	Nisin A	Kunkecin A
gram positive	<i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465 ^T	9	49
	<i>Kocuria rhizophila</i> NBRC 12708	146	197
	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	18	197
	<i>L. dextrinicus</i> JCM 5887 ^T	9	49
	<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	73	1,578
	<i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L	36	789
	<i>Lc. lactis</i> ATCC 19435 ^T	36	197
	<i>L. sakei</i> JCM 1157 ^T	9	25
	<i>L. plantarum</i> ATCC 14917 ^T	73	395
	<i>Leuc. mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	9	99
gram negative	<i>Escherichia coli</i> JM109	291	12,625
control	<i>L. kunkeei</i> FF30-6	582	789
	<i>Lc. lactis</i> NCDO497 (nisin A 生産株)	582	25,250

Table 43. 精製 kunkecin A のミツバチ消化管内細菌に対する最少活性濃度 (mM)

	Species	Nisin A	Kunkecin A
Firm-5	<i>L. helsingborgensis</i> JCM 30766 ^T	291	197
	<i>L. kimbladii</i> JCM 30767 ^T	73	49
	<i>L. melliventris</i> JCM 30770 ^T	146	13
	<i>L. apis</i> SH3-5	146	789
	<i>L. kullabergensis</i> SH3-7	9	98
Firm-4	<i>L. mellifer</i> JCM 30768 ^T	73	25
	<i>L. mellis</i> JCM 30769 ^T	73	789
FLAB	<i>Lactobacillus kunkeei</i> JCM 16173	146	197
	<i>Lactobacillus kunkeei</i> FMO-1	582	395
	<i>Lactobacillus kunkeei</i> FMO-15	582	197
	<i>Lactobacillus apinorum</i> JCM 30765 ^T	582	8
	<i>Fructobacillus fructosus</i> FMO-85	291	395
Bifido-bacterium	<i>Bifidobacterium asteroides</i> SH3-1	9	49
	<i>Bifidobacterium coryniforme</i> SH6-2	291	395
	<i>Bifidobacterium indicum</i> SH4-4	1,164	3,156
Foulbrood	<i>Melissococcus plutonius</i> ATCC 35311 ^T	36	13
	<i>Paenibacillus larvae</i> PL-1	582	395
Control	<i>Lactobacillus kunkeei</i> FF30-6	582	789

Table 44. kunkecin A 及び nisin A に対する耐性菌、感受性菌、高度感受性菌の数

		nisin A	kunkecin A
一般的な細菌	耐性菌	0	3
	感受性菌	4	4
	高度感受性菌	6	3
ミツバチ消化管内細菌	耐性菌	5	3
	感受性菌	9	8
	高度感受性菌	3	6

Table 45. ミツバチ消化管内細菌に対する FF30-6 株の培養上清の抗菌活性

Species		FF30-6 株培養上清
Firm-5	<i>L. helsingborgensis</i> JCM 30766 ^T	-
	<i>L. kimbladii</i> JCM 30767 ^T	+
	<i>L. melliventris</i> JCM 30770 ^T	+
	<i>L. apis</i> SH3-5	-
	<i>L. kullabergensis</i> SH3-7	+/-
Firm-4	<i>L. mellifer</i> JCM 30768 ^T	+
	<i>L. mellis</i> JCM 30769 ^T	-
FLAB	<i>Lactobacillus kunkeei</i> JCM 16173	-
	<i>Lactobacillus kunkeei</i> FMO-1	-
	<i>Lactobacillus kunkeei</i> FMO-15	-
	<i>Lactobacillus apinorum</i> JCM 30765 ^T	+
	<i>Fructobacillus fructosus</i> FMO-85	-
Bifido-bacterium	<i>Bifidobacterium asteroides</i> SH3-1	+/-
	<i>Bifidobacterium coryniforme</i> SH6-2	-
	<i>Bifidobacterium indicum</i> SH4-4	-
Foulbrood	<i>Melissococcus plutonius</i> ATCC 35311 ^T	+
	<i>Paenibacillus larvae</i> PL-1	-
Control	<i>Lactobacillus kunkeei</i> FF30-6	-

第 3 節 要約

本章では *L. kunkeei* FF30-6 株が生産するバクテリオシン **kunkecin A** の構造と特徴を解析し、養蜂業に利用できる可能性があるのかどうかを検討した。FLAB はミツバチ消化管内の最優勢菌の一つであることから、近年その数を減少させているミツバチのプロバイオティクスとして注目されている。ミツバチ減少の要因の一つとして *Melissococcus plutonius* による腐蛆病が知られている。腐蛆病はミツバチ幼虫で発症する法定伝染病で、現在の養蜂業ではその対策として抗生物質が用いられるが、耐性菌の出現などの問題を抱えている。我々がミツバチより分離した *L. kunkeei* FF30-6 株は *M. plutonius* に特異的に抗菌活性を示すバクテリオシン様抗菌物質を生産することがこれまでに明らかになっている。まず、バクテリオシン生産関連遺伝子を探索するために FF30-6 株のゲノム解析を行った結果、**nisin A** と類似したアミノ酸配列を有する遺伝子がプラスミド上にコードされていた。我々は **nisin A** 生合成遺伝子である *nisA* 様遺伝子を含めた 8 個のバクテリオシン生合成関連遺伝子を見出した。この **nisin A** 様物質を精製し、構造決定したところ、**nisin A** と同様に異常アミノ酸であるランチオニンを含むランチビオティックであることが明らかとなり、これを **kunkecin A** と名付けた。**Kunkecin A** は **nisin A** と比較すると抗菌スペクトルが狭く、ミツバチ消化管内善玉菌に対する抗菌活性試験を行ったところ、多くの菌株で **nisin A** よりも最少活性濃度が高かった。一方で、*M. plutonius* に対する最少活性濃度は **kunkecin A** の方が **nisin A** よりも低い値を示した。これは、**kunkecin A** が **nisin A** よりもミツバチ消化管内善玉菌への影響を小さくとどめたうえで、*M. plutonius* に対して抗菌的にはたらく可能性を示唆しており、**kunkecin A** は養蜂業において抗生物質の代替品として用いることができる可能性が示唆された。これについては、実際に幼虫における感染実験で確認される必要がある。

総括

フルクトフィリック乳酸菌 (FLAB) は花や果物、ミツバチなどの昆虫の消化管といったフルクトース豊富な環境に生息している乳酸菌群である。一般的に乳酸菌はグルコースを糖源として最も好むのに対し、FLAB はグルコースを糖源とした培養ではほとんど生育しないという非常に稀有な特徴を持つ乳酸菌である。また FLAB はグルコースをほとんど代謝できない一方で、培地中の糖源をフルクトースとした場合や、グルコースを糖源とする場合でも電子受容体存在下では良好な生育を見せるという特徴を示し、FLAB はこれまでの乳酸菌の概念から外れた乳酸菌である。このような特異な性質を有する FLAB にはこれまでに、*Fructobacillus* 属に分類される 5 菌種すべてと 200 菌種以上分類される *Lactobacillus* 属細菌の中で唯一 *Lactobacillus kunkeei* のみの合計 6 菌種が報告されていた。本研究では、これら FLAB がフルクトース豊富な環境にどのように適応してきたのかを明らかにするために、ゲノムレベルで進化の様式に迫った。また、ミツバチから分離された FLAB の養蜂業における利用の可能性を検討した。

第一章では、多様な生物生態学的特徴を有する *Lactobacillus* 属の中で唯一の FLAB である *L. kunkeei* のゲノムの特徴を明らかにするため、*L. kunkeei* と様々な *Lactobacillus* 属細菌の比較ゲノム解析を行った。その結果、*L. kunkeei* はほかの *Lactobacillus* 属細菌に比べて、ゲノムサイズを小さくし、糖代謝関連遺伝子を特異的に欠落させていることが明らかになった。特に乳酸菌の主要な糖の取り込み系の一つである Phosphotransferase system (PTS) を完全に欠損していることが明らかとなり、このような特徴は、本菌に限られた種類の糖しか代謝をすることができないという生化学的な特徴と一致していた。これらのゲノムの特徴は、先に報告されていた *Fructobacillus* 属のゲノムの構造と類似していた。この結果から、FLAB はフルクトース豊富な環境に適応する過程で、遺伝子を獲得するの

ではなく、遺伝子を欠損するという退行的進化を行ってきたことが明らかになった。またフルクトース豊富な環境が、系統的に遠縁な乳酸菌に対して非常によく似たゲノムレベルの進化を誘導する可能性があることが強く示唆された。

ここまで、*L. kunkeei* のゲノム全体の特徴を解析した。しかし、フルクトフィリックな特徴を有する直接的な原因には迫っていない。そこで、*L. kunkeei* の *adhE* に着目した解析を行った。一般的なヘテロ発酵乳酸菌のグルコース代謝におけるエタノール生産および酸化還元バランスの維持には、アセトアルデヒド脱水素酵素 (Aldh) 活性及びアルコール脱水素酵素 (Adh) 活性を有する二機能性タンパク質 AdhE が密接に関わっている。しかし先の研究により、*Fructobacillus* 属細菌は AdhE をコードする遺伝子 (*adhE*) を欠損していることが明らかにされ、酸化還元バランスを維持することができず、グルコースを代謝することができないと考えられていた。そこで *Lactobacillus* 属細菌の *adhE* に着目したゲノム解析を行った結果、*L. kunkeei* は Adh ドメインを欠損し、Aldh ドメインのみを保持した部分的な *adhE* を有していた。ヘテロ発酵を行う *Lactobacillus* 属細菌において *adhE* を欠損しているという報告は本研究が世界で初めてである。また、*L. kunkeei* と近縁な *Lactobacillus apinorum* は *Fructobacillus* 属細菌と同じく *adhE* を完全に欠損していた。*L. apinorum* はこれまで FLAB としての特徴が報告されていなかったが、*adhE* を完全に欠損しており、Aldh および Adh 活性を持たず、グルコースをほとんど代謝しないというフルクトフィリックな特徴を有していることが明らかとなった。このことから、*L. apinorum* は *Lactobacillus* 属に分類される 2 菌種目の FLAB であることが明らかになった。

第二章では、フルクトフィリックな特徴を決定づける鍵として考えられている *adhE* の欠損が、FLAB の生育特性に与える影響を明らかにすることを目的として、*F. fructosus* NRIC 1058^T 株を近縁菌種である *Leuconostoc mesenteroides* NRIC 1541^T 株の *adhE* で形質転換し、その形質転換株の生育特性を解析した。*adhE* で

形質転換した *F. fructosus* は、親株と異なり、グルコースを糖源とする培地で良好な生育を見せた。このことから、*Fructobacillus* 属は *adhE* を欠損させることで、フルクトフィリックな特徴を有していることが明らかとなった。ヘテロ発酵乳酸菌は一般的に、グルコースを代謝することで、乳酸と二酸化炭素とエタノールを生産し、その過程でグルコース 1 分子から、1ATP が生産される。しかし、FLAB はエタノールではなく、*acetate kinase* により酢酸を生産することで、グルコース 1 分子から一般的なヘテロ発酵乳酸菌の 2 倍にあたる、2ATP を生産することが可能である。このようにして、FLAB は *adhE* を欠損することで、エネルギー効率において微生物間競争を有利にしていることが示唆された。さらに、FLAB の糖代謝能が乏しい理由を明らかにするために、*F. fructosus* のゲノムデータから主要な単糖や二糖の糖代謝経路の探索を行ったところ、糖の取り込み系をほとんど見出せず、また取り込み系を保持していても代謝経路の一部が欠落しているため、代謝可能な糖の種類が少ないことが明らかとなった。

第三章では、FLAB の生態学的研究の過程でみかんの皮より分離された、特異な *Leuc. citreum* 菌株の表現性状とゲノムの特徴を明らかにした。*Leuc. citreum* は漬物などの植物環境や動物消化管などに広く生息する一般的な乳酸菌である一方で、みかんの皮から分離された F192-5 株は *Leuc. citreum* に分類されながら、グルコースを生育基質とした培地ではほとんど生育せず、電子受容体存在下で良好な生育を見せるというフルクトフィリック様の特徴を示す。F192-5 株のように菌株特異的にフルクトフィリックな特徴を有する乳酸菌の報告はこれまでにない。まず、F192-5 株とほかの *Leuc. citreum* 菌株の比較ゲノム解析を行った結果、F192-5 株のゲノムサイズはほかの *Leuc. citreum* 菌株と同程度の大きさで、*Fructobacillus* 属や *L. kunkeei* にみられた糖代謝関連遺伝子の特異的な欠落が F192-5 株には見られなかった。このため、F192-5 株は先の FLAB とは完全に異なる環境適応を行ってきたことが明らかになった。次にフルクトフィリックな特

徴を決定づける *adhE* に着目して解析を行ったところ、F192-5 株は完全長の *adhE* を保持しているが、この遺伝子は発現しておらず、F192-5 株は Aldh および Adh 活性を有していなかった。そこでゲノム上の *adhE* の周辺配列を詳細に解析したところ、ほかの *Leuc. citreum* 菌株で見られた *adhE* 上流のプロモーター領域を F192-5 株では見出すことができず、そのためグルコースを代謝できないことが予想された。そこで、F192-5 株を近縁菌種由来の *adhE* で形質転換したところ、形質転換株はグルコースを糖源とする培地で良好な生育を示した。このことから、F192-5 株は *adhE* が不活性化することで、フルクトフィリック様の特徴を有していることが明らかとなった。このように先の FLAB に見られた代謝系をシンプルにし、*adhE* を欠損させるという進化ではなく、ほかの代謝系は欠落させず、*adhE* を不活性化することのみでフルクトフィリック様の特徴を有している F192-5 株のような乳酸菌を「シュードフルクトフィリック乳酸菌」と名付けた。乳酸菌には菌株特異的にフルクトフィリック様の特徴を有している菌株が存在していることが明らかになった。これは乳酸菌が菌種内で多様性を持つという生残戦略の一つである可能性が考えられる。

第四章では、*L. kunkeei* FF30-6 株が生産するバクテリオシン *kunkecin A* の構造と特徴を解析し、養蜂業に利用できる可能性があるのかどうかを検討した。FLAB はミツバチ消化管の最優勢菌の一つであることから、近年その数を減少させているミツバチのプロバイオティクスとして注目されている。ミツバチ減少の要因の一つとして *Melissococcus plutonius* による腐蛆病が知られている。腐蛆病はミツバチ幼虫で発症する法定伝染病で、現在の養蜂業ではその対策として抗生物質が用いられるが、耐性菌の出現などの問題を抱えている。我々がミツバチより分離した *L. kunkeei* FF30-6 株は *M. plutonius* に特異的に抗菌活性を示すバクテリオシン様抗菌物質を生産することがこれまでに明らかになっている。まず、バクテリオシン生産関連遺伝子を探索するために FF30-6 株のゲノム解析を行った結果、

nisin A と類似したアミノ酸配列を有する遺伝子がプラスミド上にコードされており、我々は nisin A 生合成遺伝子である *nisA* 様遺伝子を含めた 8 個のバクテリオシン生合成関連遺伝子を見出した。この nisin A 様物質を精製し、構造決定したところ、nisin A と同様に異常アミノ酸であるランチオニンを含むバクテリオシンであることが明らかとなり、これを kunkecin A と名付けた。Kunkecin A は nisin A と比較すると抗菌スペクトルが狭く、ミツバチ消化管内善玉菌に対する抗菌活性試験を行ったところ、多くの菌株で nisin A よりも最少活性濃度が高かった。一方で、*M. plutonius* に対する最少活性濃度は kunkecin A の方が nisin A よりも低い値を示した。これは、kunkecin A が nisin A よりもミツバチ消化管内善玉菌への影響を小さくとどめたうえで、*M. plutonius* に対して抗菌的にはたらく可能性を示唆しており、kunkecin A は養蜂業において抗生物質の代替品として用いることができる可能性が示唆された。これについては、実際に幼虫における感染実験で確認される必要がある。

本研究では FLAB がフルクトース豊富な環境で行ってきたゲノムレベルの進化の様式を明らかにするとともに、FLAB の代謝産物を養蜂業に利用する可能性の有無について検討した。FLAB は *Fructobacillus* 属にみられる属レベルの進化、*L. kunkeei* や *L. apinorum* にみられる種レベルの進化、*Leuc. citreum* F192-5 株にみられる株レベルの進化というように 3 階層の進化があることが本研究により明らかになった。その中でも、属レベルと種レベルの進化は特に代謝系をシンプルにすることでゲノムサイズを小さくし、*adhE* を欠損させるという点で非常によく似た進化を行っていた。一方で、菌株レベルの進化はそれらとは全く異なっており、*adhE* を不活性化させるのみでフルクトフィリックな特徴を獲得していることが明らかとなった。これらの乳酸菌はフルクトース豊富な環境に適応し、エネルギー効率を向上させたり、菌種内で多様性を持ったりすることによって微生物間競合を有利にしてきた可能性が示唆された。FLAB はミツバチ消化管から

も主要な細菌として見出され、ミツバチ消化管への親和性の高さより、養蜂業へのプロバイオティクスとしての利用が期待されているが、FLAB の代謝産物もミツバチ腐蛆病予防などの目的で利用が可能であることが示唆された。本研究では乳酸菌の多様な特徴の一端を明らかにした。乳酸菌の多様な特徴の解析は様々な応用・利用につながることから、今後もこの分野での更なる研究の発展が望まれる。

参考文献

1. P. Mattarelli *et al.*, Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 1434-1451 (2014).
2. O. Kandler, N. Weiss, Regular, nonsporing gram-positive rods. *Bergey's manual of systematic bacteriology* **2**, 1208-1234 (1986).
3. A. Antunes *et al.*, *Leuconostoc ficulneum* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig, and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 647-655 (2002).
4. E. Dimidi, S. R. Cox, M. Rossi, K. Whelan, Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients* **11**, (2019).
5. C. L. S. Avila, B. F. Carvalho, SILAGE FERMENTATION - updates focusing on the performance of microorganisms. *J Appl Microbiol*, (2019).
6. D. Mozaffarian, Dairy Foods, Obesity, and Metabolic Health: The Role of the Food Matrix Compared with Single Nutrients. *Adv Nutr* **10**, 917s-923s (2019).
7. L. De Vuyst, S. Van Kerrebroeck, F. Leroy, Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. *Adv Appl Microbiol* **100**, 49-160 (2017).
8. R. M. Duar *et al.*, Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Rev* **41**, S27-s48 (2017).
9. C. Ceapa *et al.*, The Variable Regions of *Lactobacillus rhamnosus* Genomes Reveal the Dynamic Evolution of Metabolic and Host-Adaptation Repertoires. *Genome Biol Evol* **8**, 1889-1905 (2016).
10. G. Mulaw, T. Sisay Tessema, D. Muleta, A. Tesfaye, In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Traditionally Fermented Ethiopian Food Products. *Int J Microbiol* **2019**, 7179514 (2019).
11. S. DeWeerd, How baby's first microbes could be crucial to future health. *Nature* **555**, S18-s19 (2018).
12. G. L. C. Valente *et al.*, Short communication: In vitro and in vivo probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* B7 and *Lactobacillus rhamnosus* D1 isolated from Minas artisanal cheese. *J Dairy Sci* **102**, 5957-5961 (2019).
13. M. G. Ganzle, J. Zheng, Lifestyles of sourdough lactobacilli - Do they matter for microbial ecology and bread quality? *Int J Food Microbiol* **302**, 15-23 (2019).
14. Z. Papalexandratou *et al.*, Linking cocoa varieties and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa bean fermentations and their impact on final cocoa quality appreciation. *Int J Food Microbiol* **304**, 106-118 (2019).

15. A. Endo, Y. Futagawa-Endo, L. M. Dicks, Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Syst Appl Microbiol* **32**, 593-600 (2009).
16. N. Thaochan, R. A. Drew, J. M. Hughes, S. Vijayasegaran, A. Chinajariyawong, Alimentary tract bacteria isolated and identified with API-20E and molecular cloning techniques from Australian tropical fruit flies, *Bactrocera cacuminata* and *B. tryoni*. *J Insect Sci* **10**, 131 (2010).
17. D. P. Neveling, A. Endo, L. M. Dicks, Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers, bees and bee-hives. *Curr Microbiol* **65**, 507-515 (2012).
18. A. Endo, S. Okada, Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **58**, 2195-2205 (2008).
19. A. Endo *et al.*, *Fructobacillus tropaeoli* sp. nov., a fructophilic lactic acid bacterium isolated from a flower. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 898-902 (2011).
20. A. Endo *et al.*, Characterization and emended description of *Lactobacillus kunkeei* as a fructophilic lactic acid bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 500-504 (2012).
21. J. J. Leisner *et al.*, *Leuconostoc durionis* sp. nov., a heterofermenter with no detectable gas production from glucose. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1267-1270 (2005).
22. L. Chambel *et al.*, *Leuconostoc pseudoficulneum* sp. nov., isolated from a ripe fig. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **56**, 1375-1381 (2006).
23. C. G. Edwards, K. M. Haag, M. D. Collins, R. A. Hutson, Y. C. Huang, *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *J Appl Microbiol* **84**, 698-702 (1998).
24. A. Endo, Fructophilic lactic acid bacteria inhabit fructose-rich niches in nature. *Microb Ecol Health Dis* **23**, (2012).
25. B. Pot, E. Salvetti, P. Mattarelli, G. E. Felis, The potential impact of the *Lactobacillus* name change: The results of an expert meeting organised by the Lactic Acid Bacteria Industrial Platform (LABIP). *Trends in Food Science & Technology* **94**, 105-113 (2019).
26. A. Endo, N. Tanaka, Y. Oikawa, S. Okada, L. Dicks, Fructophilic characteristics of *Fructobacillus* spp. may be due to the absence of an alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*). *Curr Microbiol* **68**, 531-535 (2014).
27. A. Endo *et al.*, Comparative genomics of *Fructobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp. reveals niche-specific evolution of *Fructobacillus* spp. *BMC genomics* **16**, 1 (2015).
28. R. Knackstedt, J. Gatherwright, The role of thermal injury on intestinal bacterial translocation and the mitigating role of probiotics: A review of animal and human studies. *Burns*, (2019).
29. Z. Papalexandratou *et al.*, Species diversity, community dynamics, and metabolite

- kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Appl Environ Microbiol* **77**, 7698-7714 (2011).
30. I. Snauwaert, Z. Papalexandratou, L. De Vuyst, P. Vandamme, Characterization of strains of *Weissella fabalis* sp. nov. and *Fructobacillus tropaeoli* from spontaneous cocoa bean fermentations. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 1709-1716 (2013).
 31. L. O. Chuah *et al.*, Physio-chemical, microbiological properties of tempoyak and molecular characterisation of lactic acid bacteria isolated from tempoyak. *Food Microbiol* **58**, 95-104 (2016).
 32. T. Asama *et al.*, *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *J Appl Microbiol* **119**, 818-826 (2015).
 33. T. Asama, T. Uematsu, N. Kobayashi, T. Tatefuji, K. Hashimoto, Oral administration of heat-killed *Lactobacillus kunkeei* YB38 improves murine influenza pneumonia by enhancing IgA production. *Biosci Microbiota Food Health* **36**, 1-9 (2017).
 34. A. Endo, S. Salminen, Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst Appl Microbiol* **36**, 444-448 (2013).
 35. N. A. Moran, Genomics of the honey bee microbiome. *Current opinion in insect science* **10**, 22-28 (2015).
 36. A. Rangberg, G. Mathiesen, G. V. Amdam, D. B. Diep, The paratransgenic potential of *Lactobacillus kunkeei* in the honey bee *Apis mellifera*. *Benef Microbes* **6**, 513-523 (2015).
 37. D. Tamarit *et al.*, Functionally Structured Genomes in *Lactobacillus kunkeei* Colonizing the Honey Crop and Food Products of Honeybees and Stingless Bees. *Genome Biol Evol* **7**, 1455-1473 (2015).
 38. P. Filannino, R. Di Cagno, R. Addante, E. Pontonio, M. Gobbetti, Metabolism of fructophilic lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut: a focus on the phenolic acids as external electron acceptors. *Appl Environ Microbiol*, (2016).
 39. A. M. Klein *et al.*, Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Biol Sci* **274**, 303-313 (2007).
 40. N. Gallai, J.-M. Salles, J. Settele, B. E. Vaissière, Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological economics* **68**, 810-821 (2009).
 41. R. V. Durvasula *et al.*, Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 3274-3278 (1997).
 42. M. Van de Guchte *et al.*, The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 9274-9279 (2006).
 43. P. Hols *et al.*, New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus*

- thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 435-463 (2005).
44. M. G. Gänzle, M. Ehmann, W. P. Hammes, Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2616-2623 (1998).
 45. Y. Tanizawa, M. Tohno, E. Kaminuma, Y. Nakamura, M. Arita, Complete genome sequence and analysis of *Lactobacillus hokkaidonensis* LOOC260^T, a psychrotrophic lactic acid bacterium isolated from silage. *BMC genomics* **16**, 1 (2015).
 46. A. Endo, S. Okada, Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J Biosci Bioeng* **99**, 216-221 (2005).
 47. D. R. Zerbino, E. Birney, Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research* **18**, 821-829 (2008).
 48. T. Seemann, Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**, 2068-2069 (2014).
 49. Y. Tanizawa, T. Fujisawa, E. Kaminuma, Y. Nakamura, M. Arita, DFAST and DAGA: web-based integrated genome annotation tools and resources. *Biosci Microbiota Food Health* **35**, 173-184 (2016).
 50. D. H. Parks, M. Imelfort, C. T. Skennerton, P. Hugenholtz, G. W. Tyson, CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research* **25**, 1043-1055 (2015).
 51. J. Goris *et al.*, DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 81-91 (2007).
 52. A. F. Auch, M. von Jan, H. P. Klenk, M. Goker, Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci* **2**, 117-134 (2010).
 53. B. Contreras-Moreira, P. Vinuesa, GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl Environ Microbiol* **79**, 7696-7701 (2013).
 54. R. C. Edgar, MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* **5**, 113 (2004).
 55. J. Castresana, Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution* **17**, 540-552 (2000).
 56. H. Mendes-Soares, H. Suzuki, R. J. Hickey, L. J. Forney, Comparative functional genomics of *Lactobacillus* spp. reveals possible mechanisms for specialization of vaginal lactobacilli to their environment. *Journal of bacteriology* **196**, 1458-1470 (2014).
 57. S. Wittouck, S. Wuyts, C. J. Meehan, V. van Noort, S. Lebeer, A genome-based species taxonomy of the *Lactobacillus* Genus Complex. *bioRxiv*, 537084 (2019).

58. T. C. Olofsson, M. Alsterfjord, B. Nilson, E. Butler, A. Vasquez, *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 3109-3119 (2014).
59. R. L. Tatusov, M. Y. Galperin, D. A. Natale, E. V. Koonin, The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* **28**, 33-36 (2000).
60. Y. Moriya, M. Itoh, S. Okuda, A. C. Yoshizawa, M. Kanehisa, KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* **35**, W182-185 (2007).
61. G. D. Ruxton, The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney *U* test. *Behavioral Ecology* **17**, 688-690 (2006).
62. A. Endo, Y. Futagawa-Endo, M. Sakamoto, M. Kitahara, L. M. Dicks, *Lactobacillus florum* sp. nov., a fructophilic species isolated from flowers. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2478-2482 (2010).
63. E. Storåards *et al.*, Detection and identification of *Lactobacillus lindneri* from brewery environments. *Journal of the Institute of Brewing* **104**, 46-54 (1998).
64. R. Foschino, C. Arrigoni, D. Mora, A. Galli, Phenotypic and genotypic aspects of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs in Italy. *Food Microbiology* **18**, 277-285 (2001).
65. L. Kline, T. F. Sugihara, Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Applied microbiology* **21**, 459-465 (1971).
66. W. Back, I. Bohak, M. Ehrmann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, Revival of the species *Lactobacillus lindneri* and the design of a species specific oligonucleotide probe. *Systematic and applied microbiology* **19**, 322-325 (1996).
67. J. Killer, S. Dubna, I. Sedlacek, P. Svec, *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 152-157 (2014).
68. A. Loidl, K. Crailsheim, Free fatty acids digested from pollen and triolein in the honeybee (*Apis mellifera carnica Pollmann*) midgut. *Journal of Comparative Physiology B* **171**, 313-319 (2001).
69. M. P. Saa-Otero, E. Diaz-Losada, E. Fernandez-Gomez, Analysis of fatty acids, proteins and ethereal extract in honeybee pollen-considerations of their floral origin. *Grana* **39**, 175-181 (2000).
70. M. S. Blum, J. E. Bumgarner, S. Taber Iii, Composition and possible significance of

- fatty acids in the lipid classes in honey bee semen. *Journal of Insect Physiology* **13**, 1301-1308 (1967).
71. J. Praet *et al.*, Novel lactic acid bacteria isolated from the bumble bee gut: *Convivina intestini* gen. nov., sp. nov., *Lactobacillus bombicola* sp. nov., and *Weissella bombi* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* **107**, 1337-1349 (2015).
 72. M. Miwa *et al.*, Cooperation of beta-galactosidase and beta-N-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology* **20**, 1402-1409 (2010).
 73. T. Rolain *et al.*, O-glycosylation as a novel control mechanism of peptidoglycan hydrolase activity. *J Biol Chem* **288**, 22233-22247 (2013).
 74. T. Mascher *et al.*, The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *Journal of bacteriology* **185**, 60-70 (2003).
 75. F. Qi, J. Merritt, R. Lux, W. Shi, Inactivation of the *ciaH* gene in *Streptococcus mutans* diminishes mutacin production and competence development, alters sucrose-dependent biofilm formation, and reduces stress tolerance. *Infection and immunity* **72**, 4895-4899 (2004).
 76. A. Endo *et al.*, Sodium acetate enhances hydrogen peroxide production in *Weissella cibaria*. *Lett Appl Microbiol* **49**, 136-141 (2009).
 77. R. T. Yan, J. S. Chen, Coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* NRRL B592. *Appl Environ Microbiol* **56**, 2591-2599 (1990).
 78. O. K. Koo *et al.*, Cloning and characterization of the bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*) in *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *Biotechnol Lett* **27**, 505-510 (2005).
 79. T. Zheng *et al.*, Cofactor Specificity of the Bifunctional Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase (AdhE) in Wild-Type and Mutant *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *J Bacteriol* **197**, 2610-2619 (2015).
 80. S. Kawasaki *et al.*, *Lactobacillus ozensis* sp. nov., isolated from mountain flowers. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2435-2438 (2011).
 81. Q. S. McFrederick *et al.*, Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Mol Ecol* **21**, 1754-1768 (2012).
 82. T. Zaunmuller, M. Eichert, H. Richter, G. Unden, Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 421-429 (2006).
 83. J. Y. Park, S. J. Jeong, A. R. Lee, W. J. Jeong, J. H. Kim, Expression of alpha-galactosidase gene from *Leuconostoc mesenteroides* SY1 in *Leuconostoc citreum*. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 2081-2084 (2007).
 84. S. J. Jeong, J. Y. Park, H. J. Lee, J. H. Kim, Characterization of pFMBL1, a small cryptic plasmid isolated from *Leuconostoc mesenteroides* SY2. *Plasmid* **57**, 314-323

- (2007).
85. A. Kajikawa, E. Ichikawa, S. Igimi, Development of a highly efficient protein-secreting system in recombinant *Lactobacillus casei*. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 375-382 (2010).
 86. Q. Jin *et al.*, Optimization of electrotransformation conditions for *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC8293. *Lett Appl Microbiol* **55**, 314-321 (2012).
 87. J. Membrillo-Hernandez *et al.*, Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *J Biol Chem* **275**, 33869-33875 (2000).
 88. T. R. Klaenhammer, R. Barrangou, B. L. Buck, M. A. Azcarate-Peril, E. Altermann, Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 393-409 (2005).
 89. A. Cibrario, C. Peanne, M. Lailheugue, H. Campbell-Sills, M. Dols-Lafargue, Carbohydrate metabolism in *Oenococcus oeni*: a genomic insight. *BMC genomics* **17**, 984 (2016).
 90. M. D. Servinsky, J. T. Kiel, N. F. Dupuy, C. J. Sund, Transcriptional analysis of differential carbohydrate utilization by *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology* **156**, 3478-3491 (2010).
 91. O. Kandler, Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 209-224 (1983).
 92. A. Pikis, S. Immel, S. A. Robrish, J. Thompson, Metabolism of sucrose and its five isomers by *Fusobacterium mortiferum*. *Microbiology* **148**, 843-852 (2002).
 93. S. Maeno *et al.*, Genomic characterization of a fructophilic bee symbiont *Lactobacillus kunkeei* reveals its niche-specific adaptation. *Syst Appl Microbiol* **39**, 516-526 (2016).
 94. S. Maeno, A. Kajikawa, L. Dicks, A. Endo, Introduction of bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*) in *Fructobacillus fructosus* settled its fructophilic characteristics. *Research in microbiology*, (2018).
 95. A. Lonvaud-Funel, A. M. S. De Saad, Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 357-361 (1982).
 96. J. W. Hastings, M. E. Stiles, Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 127-134 (1991).
 97. L. M. T. Dicks, L. Fantuzzi, F. C. Gonzalez, M. Du Toit, F. Dellaglio, *Leuconostoc argentinum* sp. nov., isolated from Argentine raw milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **43**, 347-351 (1993).
 98. R. Kajitani *et al.*, Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome research* **24**, 1384-1395 (2014).
 99. M. G. Reese, Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the

- Drosophila melanogaster* genome. *Computers & chemistry* **26**, 51-56 (2001).
100. S. Kluser *et al.*, Global honey bee colony disorders and other threats to insect pollinators. (2010).
 101. J. J. Bromenshenk *et al.*, Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PloS one* **5**, e13181 (2010).
 102. K. Kennedy, The Daw and the Honeybee: Situating Metaphors for Originality and Authorial Labor in the 1728 Chambers' Cyclopaedia. *College English* **76**, 35-58 (2013).
 103. J. T. Kerr *et al.*, Climate change impacts on bumblebees converge across continents. *Science* **349**, 177-180 (2015).
 104. H. C. J. Godfray *et al.*, A restatement of recent advances in the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**, 20151821 (2015).
 105. N. Forfert *et al.*, Parasites and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera*) and their influence on inter-colonial transmission. *PloS one* **10**, e0140337 (2015).
 106. R. Arai *et al.*, Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *PLoS One* **7**, e33708 (2012).
 107. E. Genersch, American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of invertebrate pathology* **103**, S10-S19 (2010).
 108. E. Forsgren, European foulbrood in honey bees. *Journal of invertebrate pathology* **103**, S5-S9 (2010).
 109. R. Kemperman *et al.*, Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1589-1597 (2003).
 110. M. P. Zacharof, R. W. Lovitt, Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *Apcbee Procedia* **2**, 50-56 (2012).
 111. H. Li, R. Durbin, Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *bioinformatics* **25**, 1754-1760 (2009).
 112. H. Li *et al.*, The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-2079 (2009).
 113. S. L. Salzberg, A. L. Delcher, S. Kasif, O. White, Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic acids research* **26**, 544-548 (1998).
 114. C.-I. Cheigh, Y.-R. Pyun, Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnology letters* **27**, 1641-1648 (2005).
 115. R. Ra, M. M. Beerthuyzen, W. M. de Vos, P. E. J. Saris, O. P. Kuipers, Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. *Microbiology* **145**, 1227-1233 (1999).

Abstract

Fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) are inhabitants of fructose-rich niches, including flowers, fruits and guts of fructose-fed insects. They are differentiated from other lactic acid bacteria (LAB) by their preference for D-fructose over D-glucose on growth and a requirement of an electron acceptor for D-glucose metabolism. FLAB produce almost equimolar amounts of lactic acid and acetic acid with trace ethanol from metabolism of D-glucose. *Fructobacillus* spp. and *Lactobacillus kunkeei* are well known representatives of FLAB. *L. kunkeei* is classified as a sole fructophilic lactic acid bacterium in the genus *Lactobacillus* which contains over 300 species. Fructophilic characteristics in *Fructobacillus* spp. have been suggested to link with an absence of a bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*). European foulbrood is a highly virulent communicable disease in honeybee larvae, whose adults are the major pollinators and are agriculturally and economically important insects. A previous study suggested that *L. kunkeei* FF30-6 isolated from honeybee gut produces an antimicrobial peptide showing anti-European foulbrood pathogen activity. In this thesis, I studied genomic characteristics of *L. kunkeei*, impacts of *adhE* gene on the fructophilic characteristics in *Fructobacillus* spp., and the production system of the antimicrobial peptide by *L. kunkeei*.

The genomic structure of *L. kunkeei* was characterized by a comparison to small genome lactobacilli, bee-associated lactobacilli, vaginal lactobacilli, and *Fructobacillus* spp. *L. kunkeei* strains had significantly less CDSs and smaller genomes when compared with other lactobacilli ($p < 0.001$). Functional gene classification revealed that *L. kunkeei* had lost genes specifically involved in carbohydrate transport and metabolism ($p < 0.001$). The phosphotransferase system (PTS), which is one of the major sugar transport systems in LAB, was completely missing in *L. kunkeei*. This characteristic was similar to *Fructobacillus* spp. but distinct from small genome lactobacilli and bee-associated species.

Bifunctional ADH/ALDH protein (AdhE) is one of the key enzymes for production of ethanol from D-glucose metabolism and maintenance of the NAD⁺/NADH balance in the heterolactic phosphoketolase pathway. Generally, AdhE protein contains a C-terminal ADH domain and an N-terminal ALDH domain. On the other hand, genomes of *Fructobacillus* spp. lack whole *adhE* gene. Moreover, the *adhE* gene of *L. kunkeei* lacked the part encoding the ADH domain, which is reported here for the first time in LAB. The deletion resulted in the lack of ADH activity, implying a requirement for electron acceptors in glucose assimilation. The unique genome characteristics in *L. kunkeei* have suggested their reductive evolution that took place to adapt to the specific niches. The reduction characteristics were similar to those of *Fructobacillus* spp., but distinct from other lactobacilli with small genomes and lactobacilli with the same habitats. *L. apinorum*, originally isolated from the guts of the honeybees, also lacks *adhE* gene in its genome and possesses similar biochemical and genomic characteristics to *L. kunkeei*, indicating that *L. apinorum* is the second fructophilic species within the genus *Lactobacillus*.

To demonstrate the reason why *Fructobacillus* spp. are fructophilic, *adhE* from *Leuconostoc mesenteroides* NRIC 1541^T was cloned into a plasmid and transferred to *F. fructosus* NRIC 1058^T. The *adhE* transformed *F. fructosus* was obtained by a presumably reduced gene expression level of *adhE*. The recombinant grew on D-glucose much faster than the parental strain, indicating that the absence of *adhE* gene is the reason for its fructophilic characteristics. The recombinant produces ethanol from D-glucose instead of acetic acid. FLAB are known to metabolize only a limited number of carbohydrates. To study presence/absence of the major carbohydrate transport and metabolic pathways in *F. fructosus*, those of the major mono- and di-saccharides metabolized in LAB were predicted. Carbohydrate transport systems found in the strain were only for D-glucose, D-fructose, L-arabinose, D-ribose, D-xylose and D-galactose. Moreover, genes encoding enzymes involved in metabolic pathways were not seen for D-galactose, D-ribose, L-arabinose and

D-xylose in the strain.

During an ecological study of FLAB, *Leuconostoc citreum* F192-5 was isolated from the peel of satsuma mandarin, which showed strain-specific fructophilic-like growth characteristics in the species. On the other hand, F192-5 could ferment various carbohydrates, which differentiate the strain from known FLAB. Significant gene reduction, especially in genes involved in carbohydrate transport and metabolism were not seen in the strain. Intact *adhE* gene is conserved in the genome of F192-5, but the gene is not transcribed because of a deletion of the promoter region of *adhE* gene. The *adhE* transformed F192-5 was obtained by a presumably reduced gene expression level of *adhE*. The recombinant grew on D-glucose much faster than the parental strain. These results clearly indicated that a deletion of the promoter is the reason for the fructophilic-like characteristics of F192-5. The strain shows fructophilic-like growth characteristics but has clearly differentiated genomic characteristics from known FLAB, indicated that the strain is a pseudo-FLAB. The present study suggested that all heterofermentative LAB have a possibility to have a pseudo-fructophilic characteristics during adaptation to fructose-rich niches. This adaptation might be one of the strategies of LAB to survive under diverse environments.

One of the FLAB isolates, *L. kunkeei* FF30-6, produces an antimicrobial peptide which actively against European Foulbrood (EFB) pathogen *Melissococcus plutonius*. Genomic characterization of the strain revealed that eight genes involved in a production of bacteriocin are encoded in a plasmid named pKUNFF30-6. Deduced molecular weight of the bacteriocin was nearly equal to the bacteriocin purified from its culture supernatant. The purified bacteriocin named kunkecin A showed narrower antibacterial spectra to honeybee symbiont lactobacilli and bifidobacteria but showed stronger activity against *M. plutonius*, suggesting that the bacteriocin is a promising material to control EFB in apiaries.

This study clearly indicated a genomic-level adaptation of FLAB to fructose-rich niches.

FLAB possess smaller number of CDSs in smaller genomes as compared to their phylogenetic relatives. The *adhE* gene was partially or completely missing in all FLAB and is a key for fructophilic characteristics of FLAB. This study clearly indicated that FLAB had reductive evolution that took place to adapt to fructose-rich niches. This would be due to an efficient utilization of energy. Fructose-richness thus induced an environment-specific gene reduction in phylogenetically distant microorganisms. A unique FLAB-like *L. citreum* strain was recovered from a fructose-rich sample, and this was characterized as pseudo-FLAB, implicating a unique strain-specific evolution of LAB to survive diverse environments. Specific FLAB strain produces a novel bacteriocin, kunkecin A, which is a promising bioactive compound for antibiotics-free apiary management.

謝辞

本論文は筆者が東京農業大学生物産業学研究科生物産業学専攻博士後期課程に在籍中の成果をまとめたものである。

本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行及び本学位論文をまとめるにあたり、終始貴重なご指導を賜りました指導教官である東京農業大学 生物産業学部 食品香粧学科 応用微生物学研究室 遠藤 明仁 准教授に心より深謝いたします。

博士課程後期への進学、本研究の全般にわたる多大なご指導、ご支援を賜りました元東京農業大学 生物産業学部 食品香粧学科 中川 純一 先生に深く感謝いたします。

本研究の遺伝子組み換えを行うにあたり、プラスミド DNA (pLPD4) をご提供いただき、さらに貴重なお時間を割きご指導、ご意見賜りました東京農業大学 生物応用科学部 生物応用科学科 微生物学研究室 梶川 揚申 准教授に深く感謝いたします。

本研究は、情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所が有する遺伝研スーパーコンピュータシステムを利用しました。本研究のゲノム解析にあたり、貴重なご指導、ご助言賜りました国立遺伝学研究所 生命情報センター 谷澤 靖洋 博士、国立遺伝学研究所 生命情報センター、理化学研究所 環境資源科学研究センター 有田 正規 教授に深く感謝いたします。

本研究のゲノム解析をしていただいた東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター 矢嶋 俊介 教授、志波 優 准教授、兼崎 友 研究員、久保田 恵理 研究員に感謝いたします。

本研究の遺伝子組み換えを行うにあたりプラスミド DNA (pSJE) をご提供いただいた慶尚大学校 (大韓民国) Jeong Hwan Kim 教授に感謝いたします。

本研究のバクテリオシンの精製及び構造決定を行っていただき、貴重なお時間を割きご指導、ご意見も賜りました九州大学 農学研究員生命機能科学部門 善藤 威史 助教、大橋 千紘 さんに感謝いたします。

本研究の酵素活性を測定の手技を確立し、測定を行ってくださった本研究室 小林 聡子 さん、金谷 祐奈 さんに感謝いたします。

本研究における貴重なご意見をくださった University of Turku の Seppo Salminen 教授、Himanshu Kumar 博士、Stellenbosch University の Leon Dicks 教授に感謝いたします。

更にここですべての空のお名前を挙げることはできませんが、研究活動を共に行い、苦楽を共にした応用微生物学研究室 卒業生の諸兄姉、研究を共に励まし合い、最後まで手を抜くことなく手伝ってくれた沢山の後輩の皆々様に感謝いたします。

最後に私の思う道に進むことに対し、反対せずに温かく見守り、学生生活の最後まで精神的、経済的な支援を行って、支えてくださった父と母に深い感謝の意を表します。

以上の皆様をはじめとする、私の研究への助言や生活の支援に対し、改めて深く感謝申し上げ、謝辞といたします。

前野 慎太郎