

学 位 論 文

*Pediococcus pentosaceus* LP28 のゲノム遺伝子配列の  
特異性と細胞外多糖の特徴に関する研究

2016年4月

安武 哲也

指導教員 杉山 政則 教授

序論	3 頁
第一章 ゲノム遺伝子配列からの特異性解析	7
第一節 ゲノム遺伝子配列の決定	7
第二節 ゲノム遺伝子配列の相同性解析	9
第三節 低相同性遺伝子の機能分類	14
第四節 細胞外多糖生合成遺伝子クラスターの解析	17
第五節 プラスミド上の遺伝子解析	19
第二章 細胞外多糖 (EPS) の構造解析	21
第一節 EPS の精製	21
第二節 EPS の単糖組成分析	25
第三節 EPS に含まれるピルビン酸および酢酸の分析	26
総括	28
実験の部	
1. 使用菌株	30
2. 菌株保存方法	30
3. ゲノム遺伝子配列の解析	30
4. プラスミドの抽出と分子量の確認	31
5. 使用培地	31
6. 培地の調製方法	33
7. フラスコ培養	33
8. ジャーファーメンターによる培養	33
9. グルコース濃度の測定	34
10. 菌濃度 (濁度) の測定	34
11. 培養液中の EPS の測定	34
12. フェノール・硫酸法による EPS の定量	35
13. EPS の精製	35

1 4 . EPS の分子量測定	3 5
1 5 . EPS の単糖組成分析	3 6
1 6 . EPS 加水分解物に含まれるピルビン酸の分析	3 6
1 7 . EPS 加水分解物に含まれる酢酸の分析	3 6
引用文献	3 8
謝辞	4 4

## [序論]

乳酸菌とは、糖を資化して多量の乳酸を生産する細菌の総称であり、分類学における正式用語ではない。乳酸菌を始めとする微生物の存在を知らなかった時代から、乳酸菌や麹菌などを利用して食品を長期保存する技術がわが国で使われてきた。すなわち、乳酸菌は昔から安心・安全な微生物として、私たちの食生活に深く関わってきた。

「微生物がグルコースを分解して、アルコール、乳酸、酢酸などの有機酸や、炭酸ガスを生ずる現象」は発酵と呼ばれている。乳酸菌の存在と発酵現象を最初に発見した人物は、自然発生説を否定し、ロベルト・コッホ（Robert Koch : 1843-1910）と同じ時期に細菌学を築いた科学者の一人、ルイ・パストゥール（Luis Pasteur : 1822-1895）である。彼は、酸っぱくなったワイン、いわゆる「酸敗」したワインを保存した樽の中に酒石酸の結晶を見出し、その詳細な研究を通じて、世界に先駆けて「立体化学」の概念を提唱した。さらに彼は、「発酵現象のすべてに微生物が関与する」ことを突き止めたほか、アルコール発酵には酵母の存在が必須であることも証明している。また、ワインの酸敗は酵母とは異なる「細菌」の混入が原因で発生することを見出すとともに、酸素のない環境、すなわち「嫌気」環境において増殖可能な細菌の存在を発見し、それを嫌気性菌と呼んだ。乳酸菌の存在はパストゥールによって1857年に初めて示された。ただし、彼自身は乳酸菌の純粋分離に成功したわけではなく、1873年にそれを成功させたのは、イギリス人外科医のジョセフ・リスター（Joseph Lister : 1827-1912）であった。

ところで、発酵乳の歴史の起源は紀元前数千年前にさかのぼる。チグリス・ユーフラテス川の周辺に生活していた遊牧民が牛や山羊等の家畜を飼い、それらの乳を飲むようになった時期と一致している。家畜の腸管を水筒代わりにして乳を入れたとき、腸管内にいた乳酸菌によって凝固した乳が美味しいと感じたのであろう。それ以後、人類は乳を発酵させる技術を会得し、その方法が世界各地に広く伝搬した結果、気候や風土に適した独特な発酵乳が誕生したと考えられる。

貪食細胞に関する研究により、1908年にノーベル医学生理学賞を受賞したパストゥール研究所教授イリア・メチニコフ（Ilya Mechnikov : 1845-1916）は、腸管内で生育する細菌がつくる腐敗物質が老化の原因であるとの「自家中毒説」を提唱した。他方、ブルガリア南部のスモーリアン地方には長寿村があり、そこに住む人の多くが、酸っぱい牛乳（酸乳）を飲んでいることに注目した。メチニコフは、1908年、「酸乳を摂取すれば、酸乳中の乳

酸菌が腸内に定着して有害菌の増殖を抑えることで、老化を遅らせることができる」とする「不老長寿説」を提唱した。また、酸乳からブルガリア菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) の分離に成功し、以来、この乳酸菌を用いたヨーグルトの製造技術が欧州に普及していった。その後、ブルガリア菌は、腸内に定着できないことが判明したことが切っ掛けで、一時、酸乳による不老長寿説は鳴りを潜めた。それでも乳酸菌の研究は少しずつ世界中で進み、嫌気性菌の分離と培養技術が進んだこともあり、腸管内で生息する乳酸菌やビフィズス菌が、ヒトの健康維持に寄与していることがわかってきた。

ヒトの生命活動に必要なエネルギーを獲得するためには、腸内細菌の存在が不可欠である。これは腸内細菌叢が欠如している無菌マウスに高カロリー食を与えても体重増加がほとんど認められないことから見出された[1]。すなわち、栄養が十分に供給される腸管内は、細菌にとっては恰好の住処である。腸管内に生育する常在菌は、ヒトが消化できない成分をも栄養素として利用している。そこには1,000種類を超える細菌が、総計で100兆個以上生存しているものと推測されている。さらに、腸管内には試験管で培養困難な細菌も存在するので、腸管内細菌叢を形成する菌の種類はさらに多いものと思われる。

乳酸菌と腸内細菌叢に関する研究は1950年代に開始された。動物でもヒトでも、その腸内には、ビフィズス菌のほか、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属や、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属の乳酸菌が住んでいる。他方、ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、毒素産生性大腸菌 (toxin-producing *Escherichia coli*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) などの悪玉細菌のほか、バクテロイデス (*Bacteroides*)、ユウバクテリウム (*Eubacterium*)、嫌気性グラム陽性連鎖球菌 (*Peptostreptococcus* spp.)、酪酸菌 (*Clostridium butyricum*) なども腸管内を住処としている。善玉菌はヒトの健康維持に貢献し、悪玉菌は身体に害を及ぼすとされ、乳酸菌やビフィズス菌は善玉グループに属している。その善玉菌と悪玉菌が一定のバランスで腸内に住みつき、その中間にある細菌も加わって、そのヒト固有な腸内細菌叢が形成されている[1]。

生活習慣病の1つである肥満と腸内細菌叢の間には密接な関係があり、ヒトやマウスの腸管内の細菌のうち、ファーミキューテス門 (Firmicutes) がバクテロイデス門 (*Bacteroidetes*) に比べて優勢になることで、食餌からのカロリー回収率が上昇して体重増加につながるとの発見が報告されている[2, 3]。

現在、我が国の少子高齢化が進む中において、「健康寿命を延伸する社会」に向けた取り組みとして、高齢者のみならず現役世代からの健康づくりを目指す施策が多く進められて

いる。また、健康長寿社会の実現に向けた新たな市場の創出は、わが国の成長戦略の鍵を握る重要なテーマとなっている。こうした中で、近年、食生活において健康を維持するための科学情報が以前に増して強く求められており、特定保健用食品や機能性表示食品といった科学的なエビデンスを有した商品の開発も進んでいる。これらの中で最も注目される分野の1つとして、乳酸菌によるプロバイオティクス効果があげられる。ちなみに、プロバイオティクスとは「ヒトに保健効果を示す、安全性の担保された生きた微生物」と定義されている[1]。この定義はプロバイオティクスの安全性と機能評価を種レベルではなく、菌株レベルで科学的に検証する必要性を示している。さらに、その機能表示は医学的および栄養学的なヒト試験研究を通じて解明され、表示されるべきものと理解されている。

乳酸菌は食品や農産物からヒトや動物の体まで自然界に広く分布し、乳製品のスターターや発酵食品の製造に用いられてきたが、近年は、腸内環境改善（整腸）[4-6]、発癌リスク低減[7-9]、免疫能調節[10-12]、血圧降下[13, 14]、血液コレステロール低減[15-17]などの健康につながる数多くの作用を持つことが見出されている。これらの保健機能性は科学的に明らかになっており、乳酸菌がプロバイオティクスとして注目を集めている所以であるが、一方で、作用機序は十分には明らかになっていないことから、これらの作用機序を解明することは、更なる乳酸菌の有効利用や新たな健康増進のための機能素材、医薬品の開発などに繋がることが期待される。

乳酸菌は、分離起源や生育環境の違いから、動物由来の乳酸菌と植物由来の乳酸菌に大別することができる。果物、野菜、穀類、花、薬用植物などの表面に生息する植物由来乳酸菌は、生育のための栄養分を茎、枝、葉などの滲出液から得ており、植物のアルカロイド、タンニン、ポリフェノールなどの抗菌物質にも耐えて生息している。従って、栄養源の豊富な腸管や乳に生息する動物由来乳酸菌とは異なる特異性を有する可能性が考えられる。また、その特異性が新たなプロバイオティクス機能の発見に結びつく可能性を有している[1]。

*Pediococcus (P.) pentosaceus* は、ホモ型乳酸発酵を行う乳酸菌であり、発酵食品やサイレージから分離されていることから判断すると、動物の生体とは関係が少ないとされており、一部の菌株は、バクテリオシンと総称される抗菌性ポリペプチドの生産[18] や D-ガラクトサミン誘導性の急性肝細胞障害に対する抑制効果[19]、慢性肝疾患の抑制効果[20] を示すことが報告されている。

*P. pentosaceus* LP28 は、杉山らによりロンガン（龍眼：果物の一種）から分離された、いわゆる植物由来乳酸菌の1つである[21]。LP28 株の菌体粉末を高肥満マウスへ経口摂取させると、過栄養状態における体重増加を抑制し、白色脂肪組織重量及び肝中性脂肪（トリグリセリド）量を減少させる効果を有することが見出された[21]。また、この時、LP28 株を摂取したマウスの脂肪肝が改善され、かつ、脂肪酸の取り込みに関わる *CD36*、脂肪酸の合成に関わる *SCD1*、トリグリセリドの取り込みに関わる *PPAR $\gamma$*  の各遺伝子の発現が抑制されることも判明している。従って、LP28 株は、体脂肪の蓄積、脂質代謝異常により引き起こされる病態、すなわち、メタボリックシンドロームの代表とされる、肥満や脂質代謝異常（例えば、脂肪肝、高脂血症）等の予防、改善、もしくは治療への利用が期待される。

本研究は、*P. pentosaceus* LP28 が有する抗肥満効果の作用機序に関わる因子を解明することを目的として実施した。

## [第一章]

### ゲノム遺伝子配列からの特異性解析

趙ら[21]が行った予備実験において、*P. pentosaceus* LP28 もしくは *Lactobacillus* (*Lb.*) *plantarum* SN13T を、予め、高脂肪食を摂取させて高肥満にさせた C57BL/6J マウスに経口摂取させることで、両菌株が、*Lb. plantarum* SN35N, *Enterococcus mundtii* 15-1A, *Lb. bulgaricus* B-5b などの場合と比べて、体重をより減少させることが観察された。次に、本試験として、LP28 株と SN13T 株のいずれかを高脂肪食とともに C57BL/6J マウスに 8 週間摂取させた際の体重増加率を比較した。その結果、LP28 株摂取群では SN13T 株に比べ、マウスの体重増加率が抑制され、かつ、脂肪蓄積の抑制および肝中性脂肪量の減少が確認された[21]。

本研究では、この抗肥満効果は LP28 株特異的であり、それを決定する因子は LP28 株のゲノム上に特異的に存在するとの仮説を立て、まず、本乳酸菌株の全ゲノム配列を解読後、別の *P. pentosaceus* 株や他の乳酸菌株のそれらと比較することとした。

#### 第一節 ゲノム遺伝子配列の決定

LP28 株から抽出したゲノム DNA から、次世代シーケンサー Illumina HiSeq 2500 および Roche454 FLX Titanium を用いて、鎖長の異なる二つの DNA 断片化ライブラリーを作製し、*de novo* アセンブリー解析を実施した。一方、OpGen 社のプロトコールに従って MapCard 上にオプティカルマッピングを実施して全ゲノム制限酵素地図を作成した。この制限酵素地図上にアセンブリー解析によって得られたコンティグ配列 (DNA 断片群を重ね合わせてできた配列断片) を当てはめることでコンティグ配列の整列化を実施した。生じたギャップ領域に対しては、Illumina HiSeq 2500 のリード配列を用いて局所的にシーケンス解析を実施し、最終的な環状ゲノム遺伝子の配列を決定した。ちなみに、最終的に残存したギャップ数は 25 か所であったが、LP28 株のゲノムが環状構造 (Fig. 1) であることは証明できた。

LP28 株のゲノムは、総塩基数 1,774,865 bp (GC 含有率 37.1%) の環状ゲノム及び 5,366 bp (GC 含有率 36.5%) の環状プラスミドで構成されていた。得られた配列について Open Reading Frame (ORF) 解析を行った。その結果、環状ゲノム上には 1,683 個、プラスミド上に



は6個のORFを見出した。また、環状ゲノム内は51個のtRNA遺伝子と6個のrRNA遺伝子がそれぞれ含まれていた (Table 1)。

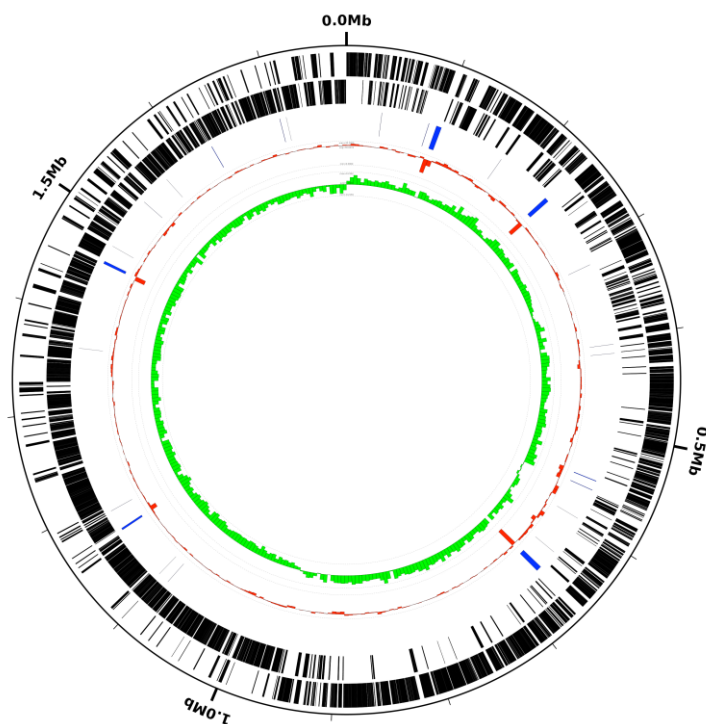


Fig. 1. *Pediococcus pentosaceus* LP28の環状染色体構造

外側からORF (+鎖), ORF (-鎖), ギャップ(青色), GC含量(赤色), GC-Skew(緑色)

Table 1. *P. pentosaceus* LP28 ゲノム遺伝子の総塩基数と遺伝子数

	Scaffold 1 (genome)	Scaffold 2 (plasmid)
塩基数	1,774,865	5,366
ギャップ数	25	0
ギャップの長さ	22,491	0
GC 比率	37.1%	36.5%
遺伝子数	1,747	6
ORF 数	1,683	6
tRNA 数	51	0
rRNA 数	6	0

GenBank 登録番号 : DF970691 (ゲノム), LC075345 (プラスミド)

## 第二節 ゲノム遺伝子配列の相同性解析

LP28 株のゲノムがコードする全 ORF のアミノ酸配列を NCBI ゲノムデータベースにて BLAST 検索し、各タンパク質の機能を解析した。また、既に全ゲノムが解読されている 4 種の *P. pentosaceus* 由来遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列と比較した。ちなみに、*Pediococcus* 属の一部は pediocin-like bacteriocin と呼ばれる、クラス IIa に属するバクテリオシン (bacteriocin) を産生することが知られ、これらの生合成遺伝子がクロモソーム、あるいはプラスミド上にコードされていることがわかっている[22, 23]。そこで、LP28 株のゲノム中にバクテリオシン生合成遺伝子が存在するか否かを調査した。その結果、LP28 株はバクテリオシンの一種 colicin V の生合成遺伝子を保有していることが予測された。

Table 2 に既に全ゲノム配列が公表されている *P. pentosaceus* の 4 株を示す。これらの菌株も LP28 株と 99%の相同性を示す colicin V の生合成遺伝子を有していた。一方、LP28 株は, prebacteriocin, pediocin PA-1 などの pediocin 様のバクテリオシン生合成遺伝子は有していなかった (Table 3)。

Table 2. ゲノム配列が解読されている *P. pentosaceus* 4 株の分離起源と機能性

<i>P. pentosaceus</i>	分離起源	機能性
ATCC25745 [24]	植物由来 (標準株)	バクテリオシン生産 [22]
LI05 (CGMCC 7049) [25]	健康人糞便	急性肝不全抑制 (マウス) [28]
SL4 [26]	キムチ	バクテリオシン生産
IE-3 [27]	酪農排水	バクテリオシン生産

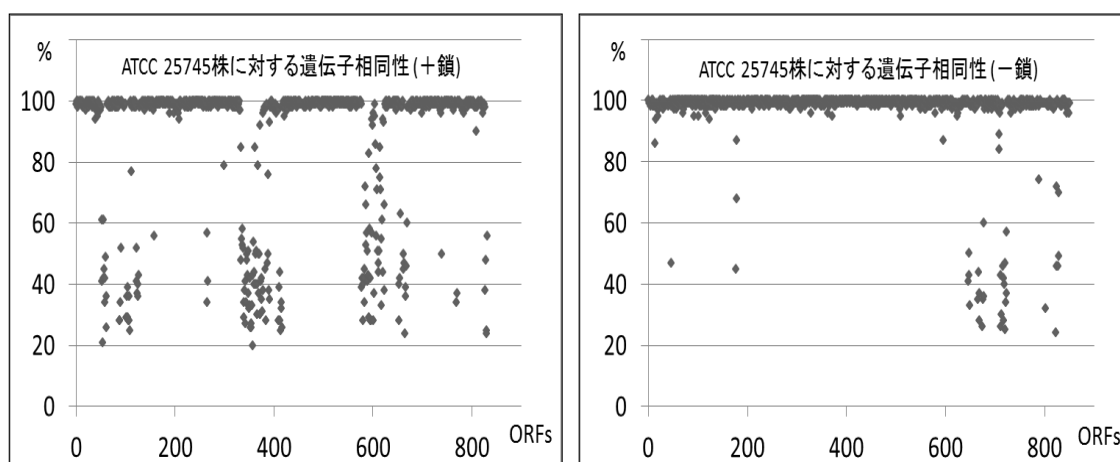
Table 3. バクテリオシン生合成遺伝子の存在 (○: あり, ×: なし)

Bacteriocins	ATCC25745	LI05	SL4	IE-3	LP28
Prebacteriocin	○	×	×	○	×
Pediocin PA-1	×	×	○	×	×
Colicin V	○	○	○	○	○

乳酸菌が生きた状態で腸管まで到達するためには、胃酸や胆汁酸に対する耐性が必要である。そこで、これらの酸耐性に関わる遺伝子が存在するか否かを調査した。その結果、LP28 株は胆汁塩に対する耐性に関与するコリルグリシンヒドラーゼ、6 つの標準ストレスタンパク質 (UspA), 硫酸レダクターゼなどの代表的な環境ストレス耐性遺伝子を他の *P. pentosaceus* が有する遺伝子と高い相同性を示す形で有していた。しかしながら、先述した *P. pentosaceus* 4 株との比較において、その他の特異的耐性遺伝子は見出せなかった。従って、消化器官内での生存性に関しては LP28 株と他の *P. pentosaceus* との間に特異性はないと結論付けた。これらの結果から、バクテリオシン産生性、あるいは腸管内での生存性に関して、LP28 株の特異性はなく、従って、これらの性質が LP28 株の抗肥満作用に関与している可能性はないと言えよう。

植物乳酸菌 LP28 株の「脂肪肝の改善や体内脂肪の蓄積抑制に有効である」との保健機能性を担う因子は、ゲノム遺伝子にコードされていることは容易に考えられる。そこで、LP28 株の環状ゲノム上に存在する 1,683 個の ORF に関して、他の 4 種の *P. pentosaceus* すべてに対して相同性が低い遺伝子を BLAST 検索した。その際、低相同性遺伝子を検索する条件として、遺伝子の塩基配列から推定されるタンパク質のアミノ酸配列の相同性が他の 4 株すべてに対して 50%以下であることを条件とした。その結果、71 個の遺伝子が抽出され、そのうちの 53 個は、コードされたタンパク質の機能予測が可能であった。

LP28 株の環状ゲノムの+鎖および-鎖に存在する遺伝子を 5'末端側から順に並べ、他の *P. pentosaceus* に対するそれぞれの相同性をプロットした結果を Fig. 2 に示す。相同性が低い遺伝子はゲノム上の複数の部位に集中して存在しており、遺伝子の交雑がゲノム上の限られた領域で生じていると推測された。



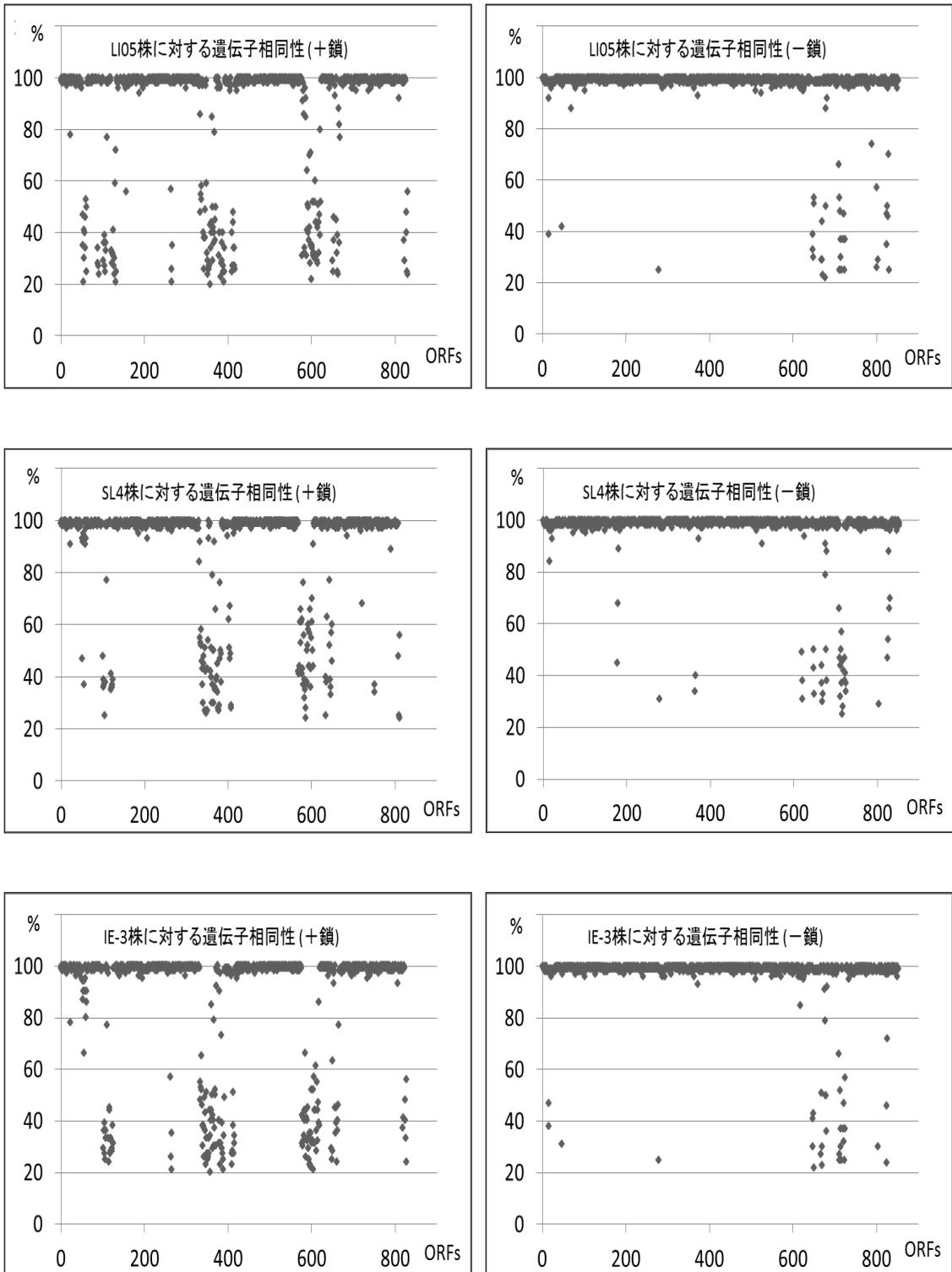


Fig. 2. 他の4種の *P. pentosaceus* に対する遺伝子配列の相同性比較

機能が推定された 53 個の低相同性タンパク質のアミノ酸配列に関して UniProt KB タンパク質データベースによる BLAST 検索を実施し, *P. pentosaceus* 以外の他の乳酸菌との相同性を評価した。その結果, Table 4 に示す通り 53 個の遺伝子のうちの 45 個は, 他の乳酸菌が有する遺伝子と高い相同性を有していた。一方, 乳酸菌を含む他の微生物に対しても相同性が 50%以下である遺伝子が, 合計 8 個存在していることを見出した。

Table 4. *P. pentosaceus* (ATCC25745, LI05, SL4, IE-3)の遺伝子に対して相同性が 50%以下である遺伝子の機能予測, およびこれらの遺伝子に最も高い相同性を示す遺伝子を有する微生物

Gene ID	Size (bp)	Best BLASTp hit				
		Functional description	Organism	Query cover	Identity	Accession
498901	1023	Transcriptional regulator	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	79	WP 002830626.1
499215	723	GntR family transcriptional regulator	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	100	78	WP 025083195.1
499221	903	LysR family transcriptional regulator	<i>Lactobacillus oleohominis</i>	98	71	WP 006915875.1
499508	1245	Phage protein	<i>Lactobacillus mucosae</i>	34	59	WP 039945879.
499594	996	Transcription regulator	<i>Pediococcus lolii</i>	98	58	WP 008841880.1
499604	291	Integrase	<i>Lactobacillus reuteri</i>	90	54	WP 003668165.1
499606	258	DNA adenine methylase	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90	58	WP 011101784.1
499656	1596	Type I restriction-modification protein subunit M	<i>Lactobacillus salivarius</i>	100	81	WP 034982262.1
499658	369	DEAD/DEAH box helicase	<i>Bacillus acidiproducens</i>	94	74	WP 018664268.1
499659	2712	DEAD/DEAH box helicase	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	99	82	WP 039651891.1
498902	717	Transaldolase	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	83	WP 002830625.1
498903	1677	PTS mannose-specific system component IICD	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	89	WP 002830624.1
498904	444	PTS mannose transporter subunit IIB	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	70	WP 036672478.1
498905	474	PTS mannose transporter subunit IID	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	90	WP 036672476.1
498907	1248	MFS family transporter	<i>Pediococcus lolii</i>	95	77	WP 008841705.1
498908	1323	Cellulase	<i>Pediococcus lolii</i>	100	71	WP 008841704.1
498909	816	AraC family transcriptional regulator	<i>Pediococcus lolii</i>	98	67	WP 008841703.1
498923	420	PTS mannose/fructose/sorbose family, IIA component	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	62	WP 005918748.1
498925	780	PTS mannose/fructose/sorbose family, IIC component	<i>Pediococcus acidilactici</i>	98	89	WP 005918752.1
498926	828	PTS mannose transporter subunit IIAB	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100	91	WP 024862695.1
498927	993	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	78	WP 005918756.1
498928	234	AraC family transcriptional regulator	<i>Oenococcus oeni</i>	76	47	WP 032818732.1
499222	399	Saccharopine dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i>	98	69	WP 042520513.1

499223	291	Saccharopine dehydrogenase	<i>Lactobacillus spicheri</i>	87	60	WP 045806518.1
499224	486	Flavodoxin family protein	<i>Lactobacillus coleohominis</i> 101-4-CHN	100	73	EEU 30733.1
499226	618	Oxidoreductase	<i>Lactobacillus coleohominis</i>	90	89	WP 006915881.1
499228	276	Transcriptional regulator	<i>Carboxydotherrnus</i> <i>ferrireducens</i>	79	49	WP 034542176.1
499234	753	Sugar phosphate isomerase	<i>Lactobacillus oryzae</i>	99	72	WP 034529439.
499235	1293	Gluconate:proton symporter	<i>Lactobacillus brevis</i>	100	77	WP 003552746.1
499236	963	2-dehydro-3-deoxygluconokinase	<i>Lactobacillus buchneri</i>	100	75	WP 014939093.1
499237	624	3-hexulose-6-phosphate synthase, Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	<i>Lactobacillus brevis</i>	100	63	WP 003552751.
499238	543	6-phospho 3-hexuloisomerase	<i>Lactobacillus buchneri</i>	100	80	WP 003558155.1
499239	975	Transcriptional regulator	<i>Lactobacillus oryzae</i>	99	56	WP 034529434.1
499240	1749	Pyruvate oxidase	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99	93	WP 004166510.1
499253	702	Transcriptional regulator	<i>Lactobacillus salivarius</i>	100	97	WP 047036269.1
499254	1017	Histidine kinase	<i>Lactobacillus salivarius</i>	100	95	WP 047036270.1
499256	1323	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	<i>Enterococcus villorum</i>	98	40	WP 010751212.1
499277	807	NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	<i>Lactobacillus curvatus</i>	98	99	WP 004271101.1
499278	1377	Branched-chain amino acid transporter II carrier protein	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	100	100	WP 004562607.1
499283	408	Transposase	<i>Lactobacillus fermentum</i> MTCC 8711	100	96	EQC 58701.1
499285	564	Transposase	<i>Lactobacillus fermentum</i>	100	85	WP 046025901.1
499286	1203	Transposase	<i>Lactobacillus</i> <i>malefermentans</i>	99	45	WP 010619804.1
499314	1158	Polysaccharide polymerase	<i>Lactobacillus casei</i>	99	35	WP 003588324.1
499316	291	Sugar phosphotransferase	<i>Pediococcus pentosaceus</i> SL4	94	49	WP 023440189.1
499317	981	<i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase	<i>Lactobacillus salivarius</i>	62	35	WP 047034941.1
499318	903	Polysaccharide pyruvyl transferase	<i>Streptococcus constellatus</i>	70	35	WP 038426319.1
499319	1377	Exopolysaccharide protein Wzx	<i>Lactobacillus pentosus</i> IG1	100	63	WP 014940887.1
499517	765	Phage recombination protein Bet	<i>Pediococcus lolii</i>	92	63	WP 008840860.1
499518	771	Prophage Lp1 protein 19	<i>Pediococcus lolii</i> NGRI 0510Q	100	78	GAC 44540.1
499524	477	Methyltransferase	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97	67	WP 016511188.1
499593	3174	Alpha-rhamnosidase	<i>Pediococcus acidilactici</i>	61	63	WP 004165687.
499595	1275	Sugar transporter	<i>Pediococcus acidilactici</i>	97	74	WP 004166827.1
499596	1173	Alpha-rhamnosidase	<i>Pediococcus acidilactici</i>	96	63	WP 004165354.1

### 第三節 低相同性遺伝子の機能分類

他の4種の *P. pentosaceus* 株に対して相同性の低かった53個の遺伝子とLP28株の保健機能性とを関連付けるため、BLAST検索によって判明した各遺伝子の予測機能を分類した。その結果、以下の6種に分類できることが判明した（下線を記した遺伝子は他の乳酸菌に対しても相同性が50%以下であった8遺伝子を示す）。また、各分類に含まれる遺伝子数の比較をTable 5に示す。

#### (1) 一次代謝関連タンパク質 (17 遺伝子)

Transaldolase : トランスアルドラーゼ (ペントースリン酸回路)

Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase : グルタミン-フラクトース6リン酸アミノ酸転移酵素

Saccharopine dehydrogenase : サッカロピン (リシン代謝中間体) 加水分解酵素 (2 遺伝子)

Flavodoxin family protein : フラボドキシシンファミリータンパク質 (窒素代謝酵素)

Oxidoreductase : 酸化還元酵素

Sugar phosphate isomerase : リン酸化糖異性化酵素

2-dehydro-3-deoxygluconokinase : 2-デヒドロ-3-デオキシグルコン酸キナーゼ

3-hexulose-6-phosphate synthase : 3-ヘキスロース-6-リン酸合成酵素

6-phospho 3-hexuloisomerase : 6-リン酸-3-ヘキスロースイソメラーゼ

Pyruvate oxidase : ピルビン酸オキシダーゼ

Histidine kinase : ヒスチジンキナーゼ

NAD dependent epimerase : 異性化酵素

Methyltransferase : メチル基転移酵素

Alpha-rhamnosidase :  $\alpha$  ラムノシド加水分解酵素 (2 遺伝子)

Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase : ピリジン核酸ジスルフィド酸化還元酵素

#### (2) 遺伝子制御タンパク質 (16 遺伝子)

transcriptional regulator : 転写制御因子 (2 遺伝子)

transcriptional regulator : 転写制御因子 (7 遺伝子)

DNA adenine methylase : DNA メチル化酵素

Type I restriction-modification protein subunit M : DNA 制限修飾酵素

DEAD/DEAH box helicase : DNA ヘリカーゼ (2 遺伝子)

Transposase : トランスポゾン転移酵素

(3) 膜輸送タンパク質 (10 遺伝子)

PTS mannose transporter subunit : マンノースの膜輸送システム (6 遺伝子)

MFS family transporter : 膜輸送タンパク質

Gluconate:proton symporter : グルコン酸/プロトン共輸送体

Branched-chain amino acid transporter II carrier protein : 分岐鎖アミノ酸輸送タンパク質

Sugar transporter : 糖輸送タンパク質

(4) 細胞外多糖生合成タンパク質 (5 遺伝子)

Polysaccharide polymerase : 多糖合成酵素

Sugar phosphotransferase : 糖リン酸転移酵素

N-acetylglucosaminyltransferase : N-アセチルグルコサミン転移酵素

Polysaccharide pyruvyl transferase : 多糖ピルビン酸化酵素

Exopolysaccharide protein Wzx : 多糖排出タンパク質

(5) 外来遺伝子タンパク質 (4 遺伝子)

Phage protein : ファージ由来タンパク質

Phage recombination protein Bet : ファージ由来タンパク質

Prophage Lp1 protein 19 : プロファージ由来タンパク質

Integrase : レトロウイルス由来酵素

(6) 分泌酵素 (1 遺伝子)

Cellulase : セルラーゼ



Table 5. 他の *P. pentosaceus* および乳酸菌に対して相同性が 50%以下の遺伝子数

分類	タンパク質機能	他の <i>P. pentosaceus</i> に対して相同性 50%以下	他の乳酸菌に対して相同性が 50%以下
(1) 一次代謝関連	transaldolase など	17	1
(2) 遺伝子制御	transcriptional regulator など	16	3
(3) 膜輸送	sugar transporter など	10	0
(4) 細胞外多糖生成	Polysaccharide polymerase など	5	4
(5) 外来遺伝子	phage protein など	4	0
(6) 分泌酵素	cellulase	1	0
合計		53	8

これら 53 個のタンパク質のうち、一次代謝関連タンパク質、遺伝子制御タンパク質、膜輸送タンパク質などは、すべて LP28 の増殖や基本的な代謝機能に関わる遺伝子であり、それらの配列特異性が本菌株の抗肥満作用に関与している可能性は低いと言える。また、外来遺伝子がコードするタンパク質に関してもファージやウイルス由来であることから、LP28 に特異的な機能を与える可能性は低いと考えられた。

一方、細胞外多糖生成に関わる 5 遺伝子のうちの 4 個が他の乳酸菌に対しても低い相同性を示したことから、およそ細胞外多糖体は、ウイルスの増殖抑制など、何らかの機能性を示すことが報告されていることから判断すると、細胞外多糖を生合成する遺伝子群が、LP28 株の抗肥満作用に関与している可能性がある。ちなみに、LP28 株が保有するセルラーゼ遺伝子は、サイレージから分離された *Pediococcus lolii* [29]のそれと 71%の相同性を示すことから、本酵素が消化器官内で発現することにより、LP28 の機能性に関与する可能性が考えられたが、LP28 の培養液中にはセルラーゼ活性が認められなかったことから、以降の検討は行わなかった。

#### 第四節 細胞外多糖生合成遺伝子クラスターの解析

乳酸菌が産生する細胞外多糖（以降 EPS : exopolysaccharide)の生合成をコードする遺伝子は、多くの場合、遺伝子クラスターを形成することが知られている。そこで、前節で機能が推定された EPS 生合成関連遺伝子近傍の ORF 機能を調査した。その結果、12 個の遺伝子 (*ppeA* ~ *ppeL*) で EPS の生合成遺伝子クラスターを構成していることが推測された (Table 6)。そのうち、5'末端側の 4 遺伝子 (*ppeA* ~ *ppeD*) については、他の *P. pentosaceus* 株と高い相同性を有していたが、その他の 8 遺伝子の相同性は最大 68%であったことから、LP28 株は他の *P. pentosaceus* 株には認められない、特異的な EPS を産生している可能性がある。

それに加えて、相同性の低い遺伝子の 1 つ *ppeK* は *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* SK53, *Bifidobacterium (B.) longum* 44B [30], *B. longum* GT-15 [31] が持つ「多糖をピルビン酸化する酵素」と、それぞれ 35%, 31%, 31%の相同性を有していたことから、LP28 株の EPS は、上記の 3 種の細菌 EPS と同様に、ピルビン酸による修飾を受けている可能性が示された。

なお *ppeD* は sugar transferase 以外に *Lactobacillus plantarum* AY01 株の priming glycosyltransferase 遺伝子に対して 64%の相同性を有しており、*ppeH* および *ppeI* は、*P. pentosaceus* IE-3 由来の glycosyltransferase 遺伝子と、それぞれ 51%および 38%の相同性を有していた。

EPS 生合成遺伝子クラスター周辺の遺伝子構造を Fig. 3 に示す。クラスターの 5'側に位置する 4 遺伝子 (*ppeA* ~ *ppeD*) は、さらに 5'側の 7 遺伝子と共通のプロモーターを持つオペロンを形成していると考えられた。これらの上流に存在する 7 遺伝子の機能を BLAST 検索したところ、それぞれ、3 種のチアミン生合成酵素、転写制御因子、DNA ヘリカーゼ、プロテアーゼ、セリン分解酵素をコードしており、同一オペロンに存在する 4 つ EPS 生合成遺伝子 (*ppeA* ~ *ppeD*) と同様、他の *P. pentosaceus* 4 株との高い相同性を示した。一方、特異性の高い配列構造を有する *ppeE* ~ *ppeL* 遺伝子は、3 つのオペロン領域 (*ppeE* ~ *ppeH*, *ppeI* ~ *ppeJ*, *ppeK* ~ *ppeL*) に分かれて制御されているものと考えられた。

Table 6. *P. pentosaceus* LP28 の EPS 生合成遺伝子クラスターの相同性調査結果

Protein	Length (aa)	Identity (%)				Functional description	BLASTp hit		Query coverage	Identity (%)	Accession
		IE-3	SL4	ATC C257 45	LI05		Organism	Organism			
PpeA	261	98	94	97	97	ESP biosynthesis protein	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100	97	WP 011673151.1	
PpeB	243	98	99	98	100	ESP biosynthesis protein	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100	100	WP 029257819.1	
PpeC	262	98	98	98	97	Capsular ESP biosynthesis protein	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100	98	ABJ 67655.	
PpeD	221	96	99	97	40	Sugar transferase	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100	96	WP 002833952.1	
PpeE	330	23	62	28	25	Glycosyltransferase family 1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	97	62	AHA 04799.1	
PpeF	335	27	51	39	27	Glycosyltransferase family 2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	96	51	WP 023440188.1	
PpeG	385	ND	ND	ND	ND	Polysaccharide polymerase	<i>Lactobacillus casei</i>	99	35	WP 003588324.1	
PpeH	181	51	68	44	48	Sugar phosphotransferase	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	97	68	WP 023440189.1	
PpeI	96	38	49	25	34	Sugar phosphotransferase	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	94	49	WP 023440189.1	
PpeJ	326	27	27	31	27	<i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase	<i>Lactobacillus salivarius</i>	62	35	WP 047034941.1	
PpeK	300	ND	ND	ND	ND	Polysaccharide pyruvyl transferase	<i>Streptococcus constellatus</i>	70	35	WP 006270484.1	
PpeL	458	ND	ND	23	23	Exopolysaccharide protein Wzx	<i>Lactobacillus pentosus</i> IG1	100	63	CCC 16059.1	
						Flippase	<i>Lactobacillus buchneri</i>	95	42	WP 014940887.1	

ND: クエリーカバー率 30%以下かつ相同性 50%以下の場合は該当遺伝子なしと判断した。

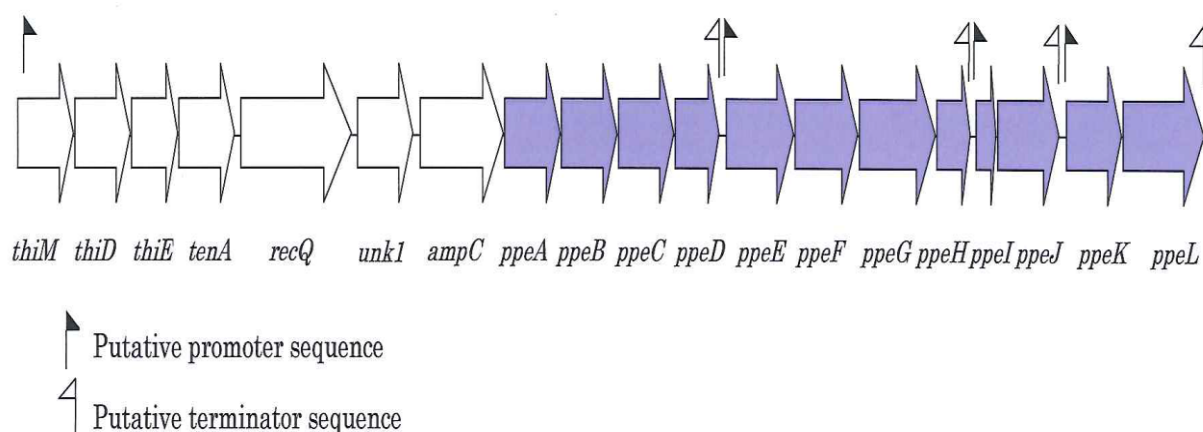


Fig. 3. EPS 生合成遺伝子クラスターの構造

#### 第五節 プラスミド上の遺伝子解析

興味深いことに、全ゲノム解析から、LP28 株が環状プラスミドを1つ保有していることが見出された。このプラスミドを pLP28 と命名した。

これまでの報告から判断すると、乳酸菌が保有するプラスミドにはバクテリオシンや多糖の生合成に関与する遺伝子が存在する可能性が高い。そこで、LP28 株を de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 培地で培養して得られた菌体からプラスミド DNA を抽出した。それを EcoRI で切断し、アガロース電気泳動にかけた結果、約 5.4 kb の DNA バンドが観察され、ゲノム解析から得られた 5,366 bp とサイズが一致した (Fig. 4)。

本プラスミド上に存在する 6 個の ORF のアミノ酸配列を BLAST 検索した結果、2 個の ORF はそれぞれ replication protein および DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE related protein と低い相同性を示し、その他 4 個の ORF は機能不明であったことから、pLP28 はいわゆる cryptic plasmid と言える (Table 7)。

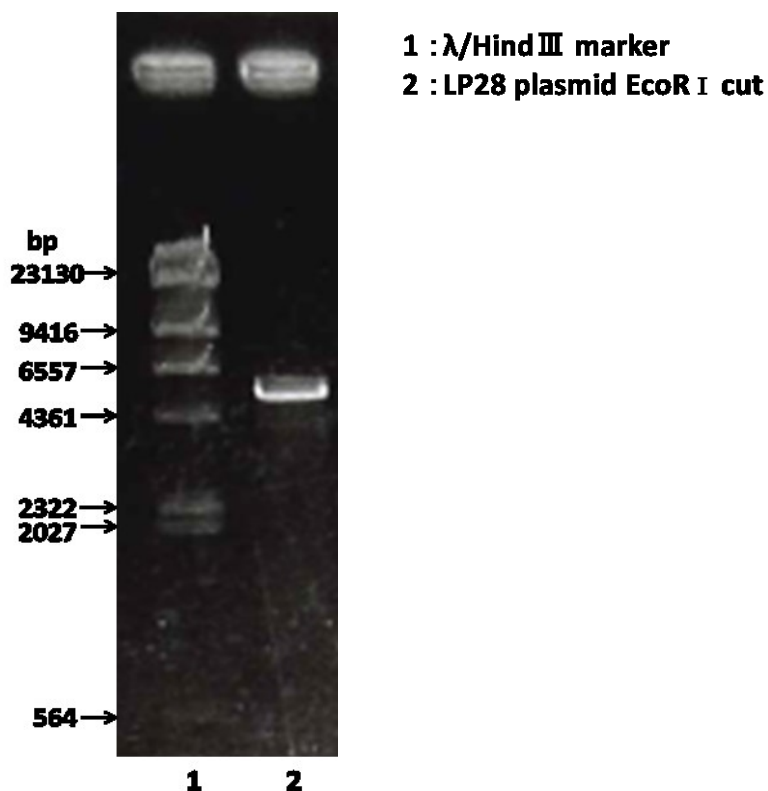


Fig. 4. プラスミド (pLP28) のアガロース電気泳動図

Table 7. プラスミド (pLP28) 遺伝子の機能解析

Gene ID	Size (bp)	Identity (%)				BLASTp hit				
		IE-3	SL4	ATC C257 45	LI05	Functional description	Organism	Query cover	Identity	Accession
500497	354	ND	ND	ND	ND	Hypothetical protein	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP1335	76	27	XP 002290956.1
500499	447	ND	ND	ND	ND	Hypothetical protein	<i>Tulasnella calospora</i> MUT 4182	68	27	KIO28177.1
500500	387	ND	ND	ND	ND	Hypothetical protein	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97	29	WP 014333955.1
500501	999	33	ND	ND	ND	Replication protein	<i>Bacillus thuringiensis</i>	89	43	WP 029437119.1
500502	1197	24	24	24	24	DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE related protein	<i>Streptococcus anginosus</i> C238	96	44	AGU 84148.1
500498	519	ND	ND	ND	ND	Hypothetical protein	<i>Lachnoanaerobaculum sp.</i> ICM7	81	28	WP 035619939.1

ND: クエリーカバー率 30%以下かつ相同性 50%以下の場合は該当遺伝子なしと判断した。

## [第二章]

### 細胞外多糖（EPS）の構造解析

#### 第一節 EPS の精製

LP28 株が産生する EPS を精製して構造解析を行う上で、培地由来の多糖類の混入を防ぐ必要がある。そこで、EPS 精製用の培地にはカゼイン加水分解物である bacto casitone を 1% 含む semi-defined medium (SDM) [32, 33] を使用した。まず、250 mL の MRS 培地を含むフラスコで、28°C、18 時間静置培養した後、その培養液から 10 mL を採り、遠心分離して得られた菌体を phosphate-buffer saline (pH 7.4) で 2 回洗浄した。その洗浄菌体を、2 L の SDM 培地を含む 3 L 容量のジャーフェーマンターに植菌して、温度 30°C、窒素通気 200 mL/min、攪拌 200 rpm の条件下で 48 時間培養した。なお、この間、25% NaOH により pH の下限を 6.0 に自動制御した。培養液中の多糖をフェノール・硫酸法により測定した結果、LP28 株は約 250 mg/mL の EPS を生産した。培養中の pH、グルコース濃度、および菌濃度 (OD<sub>610</sub>) の推移をそれぞれ Fig. 5~7 に示す。

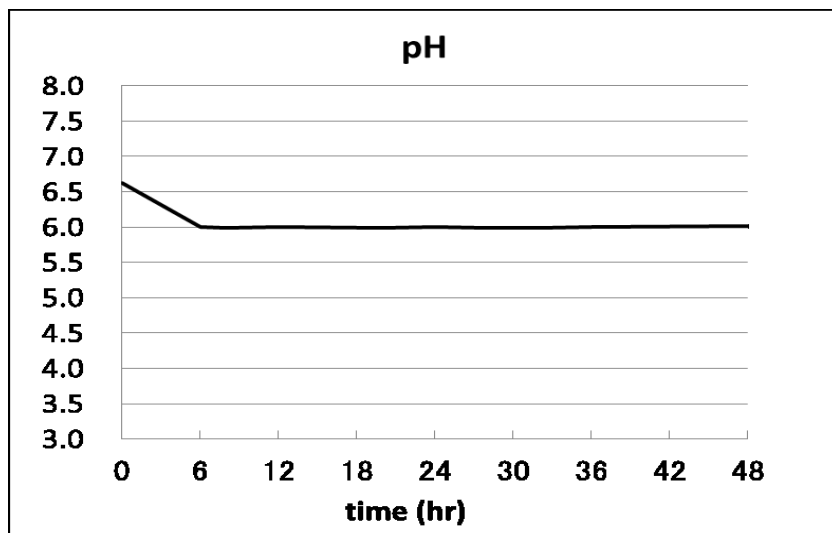


Fig. 5. pH の推移

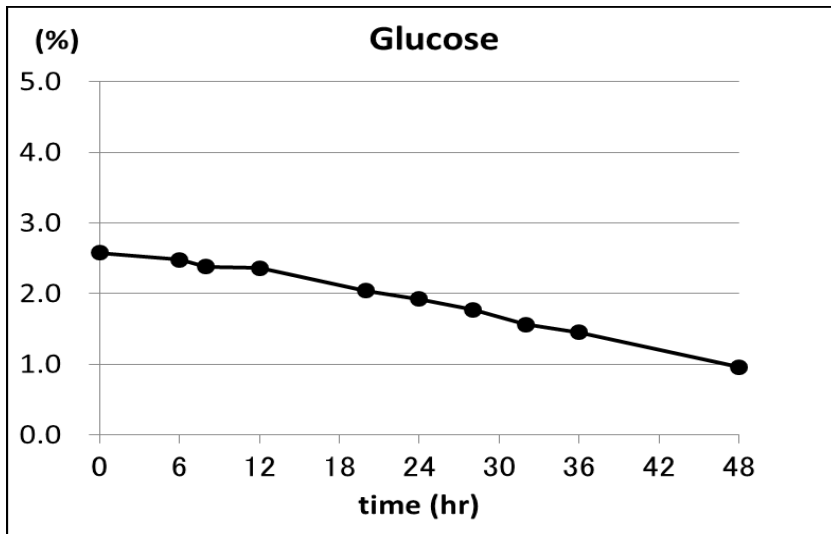


Fig. 6. グルコース濃度の推移

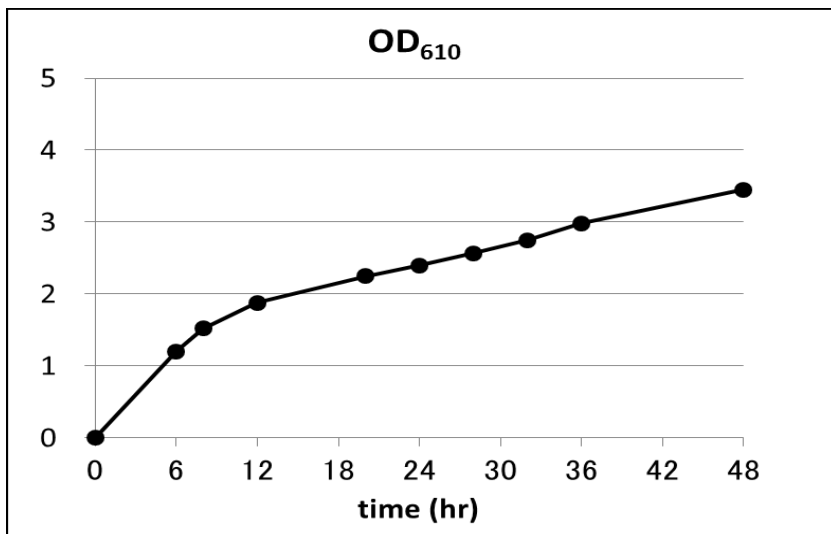


Fig. 7. 菌濃度 (OD<sub>610</sub>) の推移

培養液からの EPS 精製の流れを Fig. 8 に示す (詳細な操作内容は実験の部参照)。

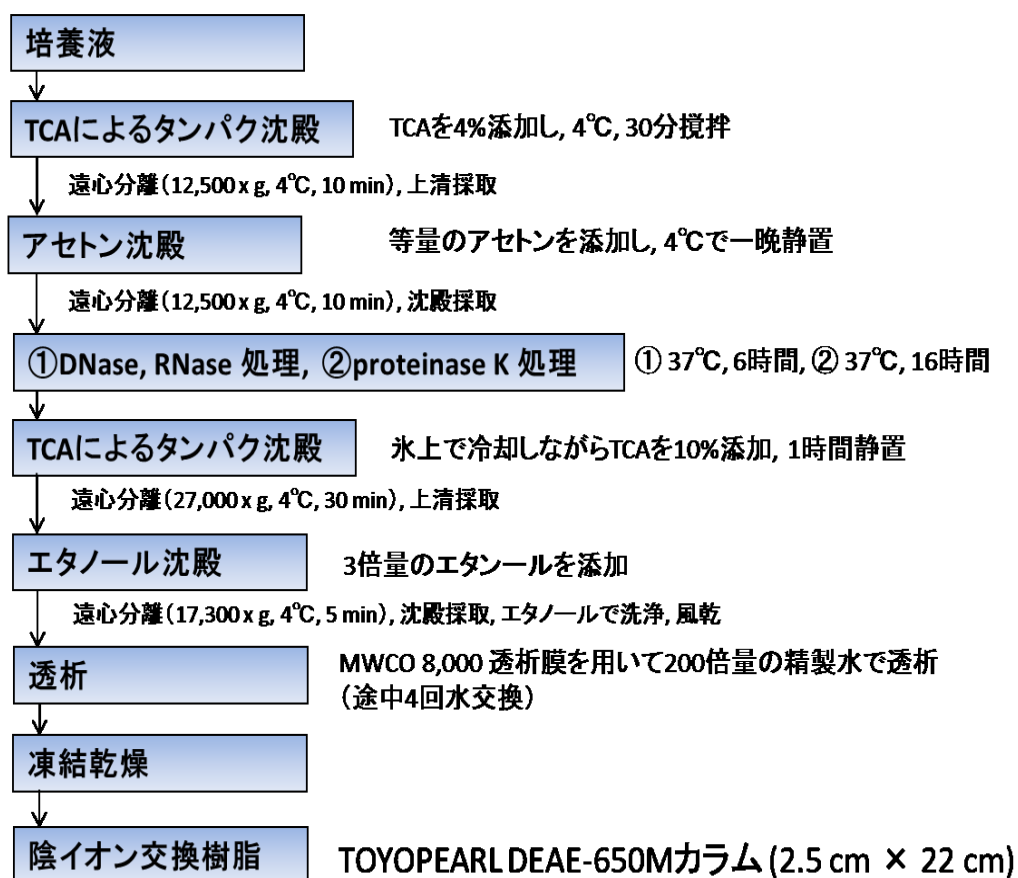


Fig. 8. EPS 精製の流れ

凍結乾燥した粗精製の EPS を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解し, TOYOPEARL DEAE-650M カラムに吸着させ, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) でカラムを洗浄し, カラム未吸着画分を採取した。一方, カラムに吸着した物質は, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いた 0 → 0.5 M NaCl の直線濃度勾配により溶出した。得られた各画分に含まれる EPS の濃度はフェノール硫酸法による呈色反応により測定した。その結果, LP28 株が産生する細胞外多糖には中性 EPS および酸性 EPS が存在することが明らかとなり (Fig. 9), 各 EPS を凍結乾燥して, 構成単糖の分析に供することとした。なお, 酸性 EPS の溶出ピークが複数に分かれたことから, 異なる酸性度の EPS が混在している可能性が示唆されたが, これらの画分は一括して酸性 EPS として分取し, 以降の検討を進めた。それぞれの EPS の分子量をゲル濾過法により測定した結果, 中性 EPS は約 40 kDa, 酸性 EPS は約 50 kDa であった。



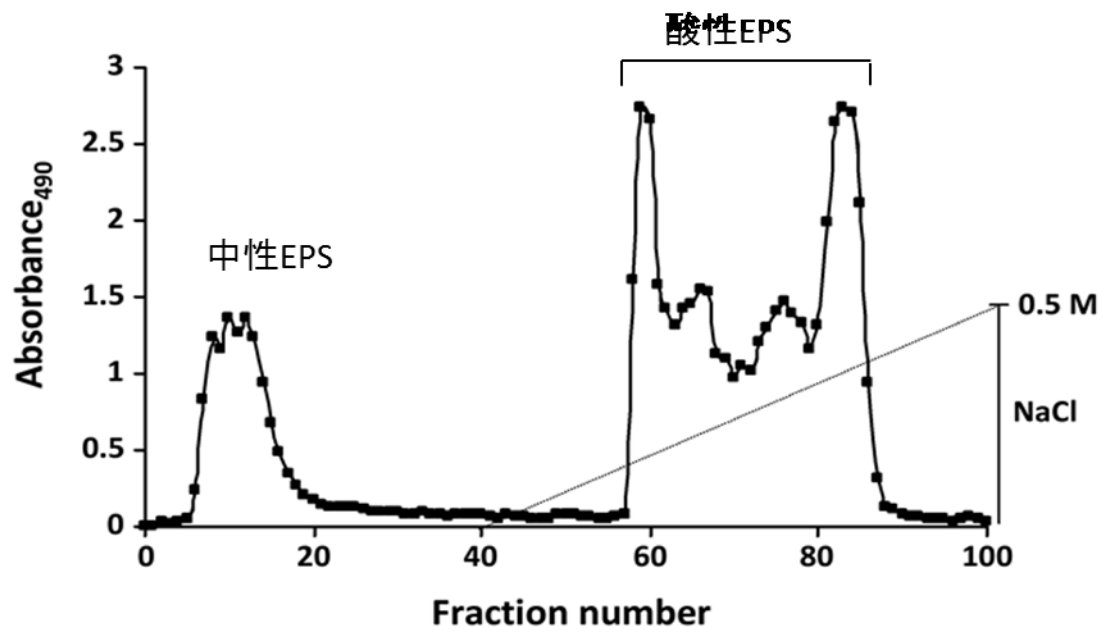


Fig. 9. 陰イオン交換樹脂 TOYOPEARL DEAE-650M による EPS の分画精製

## 第二節 EPS の単糖組成分析

中性および酸性 EPS を trifluoroacetic acid (TFA) に溶解した後、加熱処理により加水分解を行い、減圧乾燥した加水分解物を HPLC で分析した。その結果、中性 EPS からは、グルコース、マンノース、グルコサミンが検出された。一方、酸性 EPS からはグルコース、マンノース、ガラクトース、グルコサミンが検出された (Fig. 10)。それぞれの分子モル数比は Table 8 に示す。

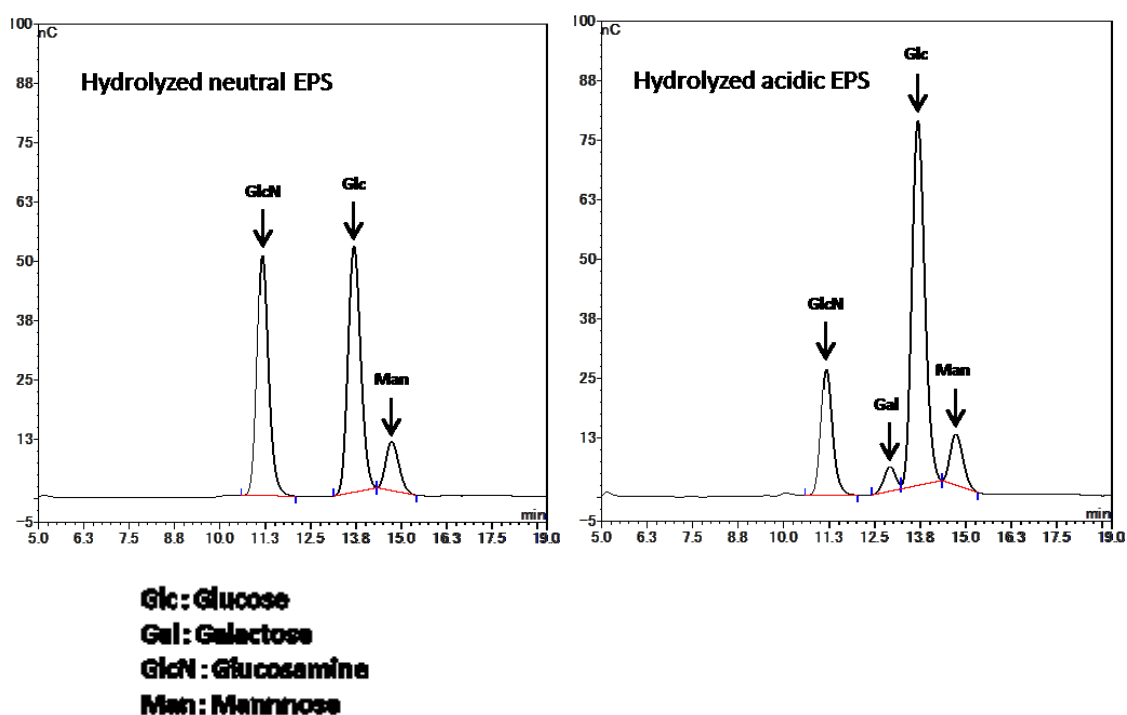


Fig. 10. 中性 EPS および酸性 EPS 加水分解物の HPLC による単糖分析

Table 8. 中性 EPS と酸性 EPS の単糖分子モル数比

Saccharide	RT (min)	Relative molar composition	
		Neutral EPS	Acidic EPS
glucosamine	11.17	3.5	1.8
Galactose	12.92	—	0.3
Glucose	13.68	4.6	6.6
Mannose	14.72	1.0	1.0

### 第三節 EPS に含まれるピルビン酸および酢酸の分析

LP28 株のゲノム解析の結果から、本菌株が EPS のピルビン酸化能を保持している可能性が示唆された。そこで、精製した中性および酸性 EPS 分子にピルビン酸が存在するか否かを検証することとした。それぞれの EPS を TFA 中で加水分解し、減圧乾燥した加水分解物を HPLC で分析した結果、酸性 EPS からピルビン酸が明らかに検出された。また、きわめて微量ではあるものの、中性 EPS にもピルビン酸と同じ位置にピークが認められたことから、ピルビン酸が含まれる可能性は否定できない結果であった (Fig. 11)。

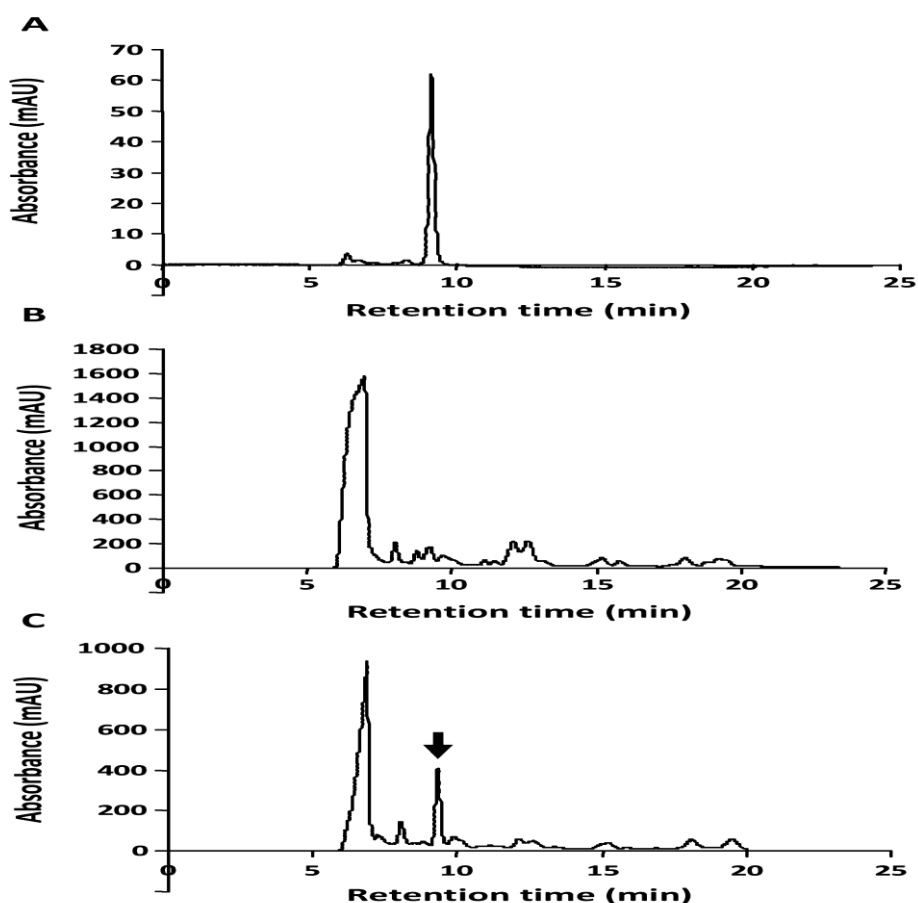


Fig. 11. 酸性 EPS および中性 EPS からのピルビン酸の検出

A: ピルビン酸 Std. (1 mM), B: 中性 EPS 加水分解物, C: 酸性 EPS 加水分解物

矢印はピルビン酸の溶出位置を示す。

中性および酸性 EPS の各加水分解物からグルコサミンが検出されたが、細胞外多糖成分としては N-アセチルグルコサミンとして存在しており、加水分解によりアセチル基が脱離していることが予想された。そこで、EPS の加水分解物中に酢酸が検出できるか否かを分析した。各 EPS を TFA 溶解し加水分解した後、加水分解溶液を HPLC で分析した結果、酸性 EPS および中性 EPS の加水分解物から、ともに酢酸が検出された。酢酸の検出量はグルコサミンのモル比に近かったことから、酢酸は N-アセチルグルコサミンから遊離したものと推定された。

以上の結果から、*P. pentosaceus* LP28 が産生する EPS は中性 EPS および酸性 EPS であり、中性 EPS はグルコース、マンノース、N-アセチルグルコサミンから構成されており、酸性 EPS はグルコース、マンノース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンから構成されていることが明らかとなった。また酸性 EPS にはピルビン酸が結合していることが判明した。

## [総括]

脂肪肝の改善と体内脂肪の蓄積抑制に有効な植物乳酸菌 *P. pentosaceus* LP28 から全ゲノム DNA を抽出し、2 種類の次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、本菌株のゲノムは環状であり、その総塩基数は 1,774,865 bp (GC 含有率 37.1%) で、かつ、1 種類のプラスミド(5,366 bp : GC 含有率 36.5%) を有することが明らかとなった。さらに、得られた塩基配列から ORF の個数を予測した結果、染色体から 1,683 個、およびプラスミドから 6 個の ORF がそれぞれ見出された。

次に、環状ゲノム上に存在する 1,683 個の ORF に関して、既に全ゲノム遺伝子が報告されている *P. pentosaceus* 4 株のそれらと比較した結果、すべての株に対してアミノ酸配列の相同性が 50%以下の遺伝子が 71 個 見出された。これらのうち 53 個については、BLAST 検索によって、タンパク質の機能予測を行った。その結果、これら 53 個のタンパク質機能は 6 種に分類された。また、これら 6 種のうちの 4 種は一次代謝関連、遺伝子制御、膜輸送、ファージ等の外来タンパク質であったことから、LP28 株の脂肪低減機能には関与していないと推定された。また、他の 1 種はセルラーゼと予測されたが、培養液中にセルラーゼ活性は検出されなかった。

一方、53 個の遺伝子の中には、別種の乳酸菌が保有する遺伝子に対しても相同性が 50%以下の遺伝子が 8 個存在していた。興味深いことに、そのうちの 4 個が細胞外多糖 (EPS) の生合成遺伝子であったことから、「LP28 株が他の乳酸菌とは異なる EPS 生合成遺伝子を保有しており、産生する EPS の特異的構造が本菌株の抗肥満効果に関与している」との可能性が示唆された。なお、プラスミド上の 6 個の ORF もすべて相同性が 50%以下であったが、DNA 複製に関わる遺伝子と低い相同性を示す 2 個と機能不明の 4 個で構成されていた。

EPS 生合成に関与していると考えられた、上記 4 遺伝子の近傍にある遺伝子を解析した結果、12 個の遺伝子から構成される EPS 生合成遺伝子クラスターが存在することが判明した。これら 12 遺伝子のうち、4 個は別株の *P. pentosaceus* と高い相同性を有していたが、それ以外の 8 遺伝子の他の乳酸菌に対する相同性は最大で 68%であった。また、相同性が低い遺伝子のひとつは、多糖のピルビン酸化を触媒する酵素と 35%の相同性を有していたことから、LP28 株の細胞外多糖がピルビン酸による修飾を受けている可能性があることが判明した。

次に、LP28 株が産生する EPS を精製して分子構造を解析するため、まず、多糖を含まな

い semi-defined medium (SDM) を使用して、pH を 6.0 で維持しながら培養した結果、約 250 mg/L の EPS を生産した。培養濾液に TCA を添加してタンパク質を沈殿除去し、得られた上清のアセトン沈殿画分に対して核酸の酵素分解処理を行った。次に、再度 TCA 沈殿、エタノール沈殿を実施後、透析して粗精製 EPS を取得した。これを陰イオン交換樹脂に吸着して NaCl の直線濃度勾配法により溶出した結果、LP28 株が産生する EPS は中性 EPS および酸性 EPS に分けられることが判明した。

中性 EPS と酸性 EPS の分子量はそれぞれ約 40 kDa, 50 kDa と推定された。また、それぞれを加水分解して HPLC 分析を行った結果、中性 EPS からはグルコース、マンノース、グルコサミンが検出され、酸性 EPS からはグルコース、マンノース、ガラクトース、グルコサミンが検出された。また、中性および酸性多糖の分解物中にそれぞれ酢酸が検出されたことから、EPS に含まれるグルコサミンは、両者とも *N*-アセチル化されたグルコサミンとして存在している。さらに、ゲノム解析の結果から、本菌株が EPS をピルビン酸化する能力を持つ可能性が示唆されたため、酸性および中性多糖のそれぞれの加水分解物を HPLC 分析したところ、酸性 EPS からはピルビン酸が検出された

これらの結果から、LP28 が産生する EPS は、グルコース、マンノース、*N*-アセチルグルコサミンからなる中性 EPS とグルコース、ガラクトース、マンノース、*N*-アセチルグルコサミン、およびピルビン酸からなる酸性 EPS であることが判明した。

乳酸菌が産生するピルビン酸化 EPS については一例のみが報告されているが、構成糖がグルコース、ガラクトース、マンノースであることから、LP28 の EPS とは明らかに分子構造が異なっている[34]。従って、LP28 が産生する EPS は、菌株特異的なものである可能性が高い。それゆえ、今後、精製した EPS の抗肥満効果を検証することで、LP28 株の有効利用や健康増進のための新規機能性素材、並びに医薬品としての開発に興味を持たれるところである。

## [実験の部]

### 1. 使用菌株

植物乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* LP28

### 2. 菌株保存方法

LP28 株を MRS 培地 40 mL を含む 250 mL 三角フラスコに植菌し、28°C で 24 時間静置培養した。得られた培養液を 33%グリセロール溶液と等量混合し、16.5%グリセロールストックを調製した。本溶液を−80°C にて凍結保存し、セルバンクとして実験に使用した。

### 3. ゲノム遺伝子配列の解析

LP28 株を MRS 培地で培養し、得られた培養液を遠心分離して菌体を回収した。その菌体から、DNeasy plant mini kit (Qiagen)を用いてゲノム DNA の抽出を行った。得られたゲノム DNA を断片化して Illumina HiSeq 2500 を用いてシーケンシングした Paired-end library (リード長 約 200 bp) , および Roche454 FLX Titanium を用いてシーケンシングした Mate Pair Library (リード長 約 350 bp)を作製した。得られた両リード配列に対して、Newbler v2.8 (Roche 454 FLX シーケンサーに付属の解析ソフトウェア)を用いて de novo アセンブリー解析を実施した。一方、OpGen 社のプロトコールに従って、MapCard 上にゲノム DNA 溶液を添加し、制限酵素処理及び蛍光染色を行った後、各 DNA 断片の長さを測定することで全ゲノム制限酵素地図を作成した。この全ゲノム制限酵素地図上に上記のアセンブリー解析で得られたコンティグ配列を当てはめることで、コンティグ配列の整列化を実施した。

得られた環状化ドラフト配列について、Illumina Paired-end リード配列を用いたギャップクローズ解析を以下の手順で実施した。

- (1) BWA [35] による Illumina Paired-end リード配列のマッピング
- (2) 各ギャップ領域について近傍にユニークマップされたリードとその mate 配列の収集
- (3) Velvet [36] を用いた(2)のアセンブリー
- (4) 上記で得られたコンティグ配列とギャップ周辺配列とのアラインメント、およびアラインメントに基づくギャップ配列の置換
- (5) ギャップが無くなるまで(1)~(4)の繰り返し

#### 4. プラスミドの抽出と分子量の確認

LP28 株を MRS 培地で培養し、得られた培養液を遠心分離して菌体を回収し、Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche 社)を用いてプラスミド DNA を抽出した。抽出時に lysozyme (和光純薬社) および achromopeptidase (和光純薬社) をそれぞれ 4 mg/mL 添加し、室温で 2~3 時間インキュベートした。抽出されたプラスミド DNA を制限酵素 EcoRI で切断し、約 20 ng を 0.8%アガロースゲル (低電気浸透・高ゲル強度: ナカライテスク, 02468-66) を用いて電気泳動した。電気泳動槽は Mupid-2plus (ADVANCE 社製)を使用し、電圧 100 V にて約 30 分間泳動した後、臭化エチジウム染色を行った。 $\lambda$ HindIII マーカー (TAKARA, 3403) を同時に泳動することでプラスミドの分子量を確認した。

#### 5. 使用培地

[de Man, Rogosa and Sharpe 培地 (MRS 培地)]

Peptone	1.0 (w/v) %
Beef extract	0.8 (w/v) %
Yeast extract	0.4 (w/v) %
Glucose	2.0 (w/v) %
Tween 80	0.1 (w/v) %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 (w/v) %
Sodium acetate	0.5 (w/v) %
Ammonium citrate	0.2 (w/v) %
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 (w/v) %
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.005 (w/v) %



[Semi-defined 培地 (SDM)]

Glucose	2.0 (w/v) %	
Tween 80	0.1 (w/v) %	
Ammonium citrate	0.2 (w/v) %	
Sodium acetate	0.5 (w/v) %	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 (w/v) %	
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.005 (w/v) %	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 (w/v) %	
Bacto casitone (Difco)	1.0 (w/v) %	
Vitamin solution *1	1 mL (add after autoclave)	
Trace element solution *2	1 mL (add after autoclave)	pH 6.5 ± 0.2

\*1 Vitamin solution (per liter)

4-aminobenzoic acid	0.1 g
Biotin	2 mg
Folic acid	50 mg
Lipoic acid	50 mg
Nicotinic Acid	0.2 g
Pantothenic acid	0.1 g
Pyridoxamine-HCl	0.5 g
Vitamin B12	0.1 g
Pyridoxine	50 mg
Riboflavin	0.1 g
Thiamine	0.2 g

\*2 Trace element solution (per liter)

HCl 25 (v/v) %	10 ml
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.5 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.19 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1 g

ZnCl <sub>2</sub>	70 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36 mg
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	24 mg
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2 mg

## 6. 培地の調製方法

### (1) MRS 培地

Becton, Dickinson and Company 製 (Difco) の MRS 培地を脱イオン水に規定量溶解し (pH 6.2 ± 0.2), フラスコまたは 3 L 容ジャーフェーマンターに所定の液量を入れた後, オートクレーブ殺菌を実施して培養に使用した。殺菌条件は 121°C / 20 分 (フラスコ) および、122°C / 20 分 (ジャー) とした。

### (2) Semi-defined 培地 (SDM)

グルコースを除く各組成物を所定量計量し, 脱イオン水に溶解した後, 118°C / 15 分間オートクレーブ殺菌を実施した。グルコースの 23 (w/v) % 水溶液を調整し, 122°C / 20 分間オートクレーブで殺菌した後, 所定の濃度になるようにその他の培地殺菌液と混合した。Vitamin solution および Trace element solution は各組成物を所定量脱イオン水に溶解し, 0.2 μm フィルターにより濾過滅菌を行った後に所定量を添加した。

## 7. フラスコ培養

ジャーフェーマンターでの培養試験に用いるシード培養は, 30 mL または 40 mL の MRS 培地を 250 mL 三角フラスコに入れて殺菌し, セルバンク (Cell bank) を 0.4% (120 μL または 160 μL) 植菌して, 28°C で 18 時間または 24 時間, 静置することで実施した。EPS の精製を目的とした培養の際は, シード培養液 10 mL を遠心集菌し, phosphate-buffer saline (pH 7.4) で 2 回洗浄後, 全量を SDM 2.3 L に植菌した。

## 8. ジャーフェーマンターによる培養

ジャーフェーマンター装置は, いわしや製 3 L 容 Mini Jar Fermenter を使用した。使用する培地はあらかじめ前述の手順にて調製し, 2 L 容三角フラスコに入れて殺菌した。ジャーフェーマンターのベッセルは, キャリブレーションを実施した pH センサーを装着し, 0.2 μm

のエアフィルターを装着した通気ラインおよび NaOH 注入ラインの取り付け部に綿栓をして、121°C、30 分間オートクレーブ殺菌した。常温に冷却後、殺菌した培地をクリーンベンチ内でベッセルに無菌的に仕込んだ上で、培養装置に設置し、通気ラインおよび NaOH 水溶液ラインを繋いでセットアップした。培養待機中は通気ラインから空気または N<sub>2</sub> ガスを毎分 50 mL 送り込み、ベッセル内の無菌性を維持した。

培養開始前に温度および攪拌回転数を所定の値に合わせ、シード培養液を 1 mL 添加することで培養を実施した。培養液の pH はセンサーからの測定値により、NaOH 水溶液ラインのペリスタ式ポンプを自動的に回転させることで制御した。

#### 3 L 容ジャーフェーマンターの基本的な培養条件

培地仕込量	2.3 L
培養温度	30°C
攪拌回転数	200 rpm
通気量（空気または N <sub>2</sub> ガス）	200 mL/min
培養日数	24-48 時間

#### 9. グルコース濃度の測定

測定器の測定レンジに応じて脱イオン水で希釈した培養液を 3,500 ×g で遠心分離した後、上清液のグルコース濃度を王子計測機製グルコース分析器 BF-30AS を用いて測定した。

#### 10. 菌濃度（濁度）の測定

日立製分光光度計 U-1100 を用いて、測定レンジに応じて培養液を脱イオン水で希釈した後に OD<sub>610</sub> を測定した。

#### 11. 培養液中の EPS の測定

培養液 25 mL を 10,000 ×g、4°C、10 min 遠心分離し、得られた上清 20 mL に対して等量の 40%トリクロロ酢酸溶液を添加して、タンパク質を沈殿させた後、遠心（13,000 ×g、4°C、10 min）により EPS を含む上清を得た。この上清 20 mL に等量のアセトンを添加し、攪拌後、氷上で 1 時間放置し、EPS を沈殿化した後、遠心（13,000 ×g、4°C、10 min）により、EPS を採取した。これを 70%エタノール（3 mL）で洗浄した後、減圧乾燥し、乾燥した EPS

を水 5 mL に溶解し、フェノール・硫酸法により定量した。

#### 12. フェノール・硫酸法による EPS の定量

EPS を含む試料 0.5 mL に 5%フェノール水溶液を 0.5 mL 添加した後、2.5 mL の濃硫酸を加えて、2 時間経過後、490 nm の吸光度を測定した。グルコース（無水）を溶解して調製した標準液を用いて作成した検量線に基づき多糖濃度を定量した。

#### 13. EPS の精製

培養液に trichloroacetic acid (TCA) を 4%加え、4°C で 30 min 攪拌した後、12,500 ×g, 4°C, 10 min の遠心により上清を取得した。その上清に等量のアセトンを加え、4°C で一晩静置後、12,500 ×g, 4°C, 10 min の遠心により沈殿を集めた。この沈殿を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解した後、27,000 ×g, 4°C, 30 min の遠心で得られた上清に DNase および RNase をそれぞれ 10 µg/mL になるように加え、37°C で 6 時間インキュベートした。さらに proteinase K を 20 µg/mL になるように加え、37°C で 16 時間インキュベートした。氷上で冷却しながら反応液に 100% TCA を 10%加え、1 時間静置した後、27,000 ×g, 4°C, 30 min の遠心により上清を取得した。上清に 3 倍量の 100 %エタノールを加え、17,300 ×g, 4°C, 5 分間の遠心により沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。沈殿を精製水に溶解し、MWCO 8,000 透析膜を用いて 200 倍量の精製水に対して 2 日間透析した（途中、水を 4 回交換）。透析後、凍結乾燥により粗精製 EPS を得た。粗精製 EPS を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解し、TOYOPEARL DEAE-650M カラム (2.5 cm × 22 cm) に吸着させた。50 mM Tris-HCl (pH 8.0) による溶出分画（流速 1.0 mL/min）の後、同緩衝液を用いた 0→0.5 M NaCl の直線濃度勾配により溶出フラクションを分画した。各フラクションの EPS 濃度はフェノール硫酸法による呈色反応により測定した。

#### 14. EPS の分子量測定

EPS の分子量は Sephacryl S-500 HR (GE Healthcare 社) によるゲル濾過クロマトにより測定した。

移動相 0.1 M NaNO<sub>3</sub>

流速 0.8 mL/min

検出器 RI-2031 Plus, Jasco 社

デキストラン分子量標準品 (Sigma 社) を用いて分子量を算出

#### 15. EPS の単糖組成分析

中性および酸性 EPS 5 mg をそれぞれ 2 M の trifluoroacetic acid (TFA) 1 mL に溶解し, 120°C で 2 時間加水分解を行った。加水分解溶液を減圧下で遠心乾燥させ, 残渣を 100  $\mu$ L の精製水に溶解し, 0.2  $\mu$ m のフィルターで清澄化した後, HPLC 分析を行った。HPLC の条件を以下に示す。

Thermo Scientific ICS-5000 システム

分離カラム : CarboPac PA1 2 $\times$ 250 mm

ガードカラム : CarboPac PA1 2 $\times$ 50 mm

移動相 : 16 mM 水酸化ナトリウム溶液

カラム温度 : 30°C

検出器 : Pulsed amperometric electrochemical detector

流量 : 0.25 mL/min

注入量 : 20  $\mu$ L

#### 16. EPS 加水分解物に含まれるピルビン酸の分析

EPS 2 mg を 2 M の trifluoroacetic acid (TFA) 1 mL に溶解し, 120°C, 2 時間加水分解を行った。加水分解溶液を減圧下で乾燥し, 3.8 mM の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> に溶解した後, HPLC 分析を行った。

分離カラム : Aminex HPX-87H (Bio-Rad)

移動相 : 3.8 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

検出器 : UV (210 nm)

流量 : 0.6 mL/min

#### 17. EPS 加水分解物に含まれる酢酸の分析

EPS 2 mg を 2 M の trifluoroacetic acid (TFA) 1 mL に溶解し, 120°C, 2 時間加水分解を行っ

た。加水分解溶液を HPLC で分析した。

分離カラム：Shodex RS pak, KC-811

移動相：1.0 mM perchloric acid

検出器：Conductivity Detector

流量：1 mL/min

## [引用文献]

- [1] 杉山 政則, 現代乳酸菌科学, 共立出版, 2015年12月出版
- [2] M. Bajzer and R. J. Seeley, Physiology: obesity and gut flora, *Nature* 444 (2006) 1009-1010.
- [3] R. E. Ley, P. J. Tumbauqh, S. Klein and J. I. Gordon, Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity, *Nature* 444 (2006) 1022-1023.
- [4] J.A. Vanderhoof, D.B. Whitney, D.L. Antonson, T.L. Hanner, J.V. Lupo and R.J. Young, *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children, *J. Pediatr.* 135 (1999) 564-568.
- [5] S.-D. Xiao, D.-Z. Zhang, H. Lu, S.-H. Jiang, H.-Y. Liu, G.-S. Wang, G.-M. Xu, Z.-B. Zhang, G.-J. Lin and G.-L. Wang, Multicenter, randomized, controlled trial of heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB in patients with chronic diarrhea, *Adv. Ther.* 20 (2003) 253-260.
- [6] M. Olivares, M.P. Diaz-Ropero, N. Gomez, F. Lara-Villoslada, S. Sierra, J.A. Maldonado, R. Martin, E. Lopez-Huertas, J.M. Rodriguez and J. Xaus, Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults, *Int. J. Food Microbiol.* 107 (2006) 104-111.
- [7] J.J. Rafter, The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention, *Scand. J. Gastroenterol.* 30 (1995) 497-502.
- [8] B.L. Pool-Zobel, C. Neudecker, I. Domizlaff, S. Ji, U. Schillinger, C. Rumney, M. Moretti, I. Vilarini, R. Scassellati-Sforzolini and I. Rowland, *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats, *Nutr. Cancer* 26 (1996) 365-380.
- [9] Y. Ohashi, S. Nakai, T. Tsukamoto, N. Masumori, H. Akaza, N. Miyanaga, T. Kitamura, K.

- Kawabe, T. Kotake, M. Kuroda, S. Naito, H. Koga, Y. Saito, K. Nomata, M. Kitagawa and Y. Aso, Habitual intake of lactic acid bacteria and risk reduction of bladder cancer, *Urol. Int.* 68 (2002) 273-280.
- [10] K. Shida, K. Makino, A. Morishita, K. Takamizawa, S. Hachimura, A. Ametani, T. Sato, Y. Kumagai, S. Habu and S. Kaminogawa, *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115 (1998) 278-287.
- [11] D. Fujiwara, S. Inoue, H. Wakabayashi and T. Fujii, The anti-allergic effects of lactic bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 135 (2004) 205-215.
- [12] M.A. Kalliomaki and E. Isolauri, Probiotics and down-regulation of the allergic response, *Immunol. Allergy Clin.* 24 (2004) 739-752.
- [13] H. Meisel and W. Bockelmann, Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, (1999) 207-215.
- [14] F. Minervini, F. Algaron, C.G. Rizzello, P.F. Fox, V. Monnet and A. Gobbetti, Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 5297-5305.
- [15] D.I.A. Pereira, A.L. McCartney and G.R. Gibson, An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, determination of its cholesterol-lowering properties, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 4743-4752.
- [16] C.-G. Ha, J.-K. Cho, C.-H. Lee, Y.-G. Chai, Y.-A. Ha and S.-H. Shin, Cholesterol lowering effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from faces, *J. Microbiol. Biotechnol.* 16 (2006) 1201-1209.



- [17] T.D.T. Nguyen, J.-H. Kang and M.-S. Lee, Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects, *Int. J. Food Microbiol.* 113 (2007) 358-361.
- [18] M.E. Martino, M. Maifreni, M. Marino, I. Bartolomeoli, L. Carraro, L. Fasolato and B. Cardazzo, Genotypic and Phenotypic diversity of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from food matrices and characterisation of the penocin operon, *Antonie Van Leeuenhock*, 103 (2013) 1149-1163.
- [19] L.-X. Lv, X.-J. Hu, G.-R. Qian, H.-Zhang, H.-F. Lu, B.-W. Zheng, L. Jiang and L.-J. Li, Administration of *Lactobacillus salivarius* LI01 or *Pediococcus pentosaceus* LI05 improves acute liver injury induced by D-galactosamine in rats, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 5619-5632.
- [20] S. Bengmark, Bio-ecological control of chronic liver disease and encephalopathy, *Metab. Brain Dis.* 24 (2009) 223-236.
- [21] X. Zhao, F. Higashikawa, M. Noda, Y. Kawamura, Y. Matoba, T. Kumagai and M. Sugiyama, The obesity and fatty liver are reduced by plant-derived *Pediococcus pentosaceus* LP28 in high fat diet-induced obese mice, *Plos One* 7 (2012) e30696.
- [22] D. B. Diep, L. Godager, D. Brede and I. F. Nes, Data mining and characterization of a novel pediocin-like bacteriocin system from the genome of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, *Microbiology* 152 (2006) 1649-1659.
- [23] 日本乳酸菌学会編, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会, 2010年11月出版

- [24] K. Makarova, A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, DM. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, JH. Lee, I. Díaz-Muñiz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer and D. Mills, Comparative genomics of the lactic acid bacteria, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 103 (2006) 15611-15616.
- [25] L.-X. Lv, Y.-D. Li, X.-J. Hu, H.-Y. Shi and L.-J. Li, Whole-genome sequence assembly of *Pediococcus pentosaceus* LI05 (CGMCC 7049) from the human gastrointestinal tract and comparative analysis with representative sequences from three food-borne strains, Gut Pathog. 6 (2014) 36.
- [26] S.H. Dantoft, E.M. Bielak, J.G. Seo, M.J. Chung and P.R. Jensen, Complete genome sequence of *Pediococcus pentosaceus* strain SL4. Genome Announc. 26 (2013) e01106-e01113.
- [27] S. Midha, M. Ranjan, V. Sharma, A. Kumari, P.K. Singh, S. Korpole and P.B. Patil, Genome sequence of *Pediococcus pentosaceus* strain IE-3, J. Bacteriol. 194 (2012) 4468.
- [28] Lv LX, Hu XJ, Qian GR, Zhang H, Lu HF, Zheng BW, Jiang L, Li LJ, Administration of *Lactobacillus salivarius* LI01 or *Pediococcus pentosaceus* LI05 improves acute liver injury induced by D-galactosamine in rats. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98 (2014) 5619-5632
- [29] K. Doi, K. Mori, K. Tashiro, Y. Fujino, Y. Nagayoshi, Y. Hayashi, S. Kuhara and T. Ohshima, Draft genome sequence of *Pediococcus lolii* NGRI 0510Q(T) isolated from ryegrass silage, Genome announc. 1(1) (2013) Pii: e00156-12.
- [30] A.N. Shkoporv, B.A. Efimov, E.V. Khokhiova, A.V. Chaplin, L.I. Kafarskaya, A.S. Durkin, J. McCarrison, M. Torralba, M. Gillis, G. Sutton, D.B. Weibel, K.E. Nelson and V.V. Smeianov,

Draft genome sequence of two pairs of human intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains, 44B and 1-6B and 35B and 2-2B, consecutively isolated from two children after a 5-year time period, *Genome Announc.* 1(3) (2013) Pii: e00234-13.

[31] N.V. Zakharevich, O.V. Averina, K.M. Klimina, A.V. Kudryavtseva, A.S. Kasianov, V.J. Makeev and V.N. Danilenko, Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* GT15: Unique genes for Russian strains, *Genome Announc.* 2(6) (2014) Pii: e01348-14.

[32] S.A. Kimmel and R.F. Roberts, Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR., *Int. J. Food Microbiol.* 40 (1998) 87-92.

[33] E.P.W. Kets, E.A. Galinski and J.A.M. de Bont, Carnitin: a novel compatible solute in *Lactobacillus plantarum*, *Arch. Microbiol.* 162 (1994) 243-248.

[34] M.R. Van Calsteren, C. Pau-Roblot, A. Begin and D. Roy, Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain RW-9595M and R, *Biochem. J.* 363 (2002) 7-17.

[35] H. Li, and R. Durbin, Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25 (2009) 1754-1760.

[36] D. R. Zerbino and E. Birney, Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs., *Genome Res.* 18 (2008) 821-829.

[学位論文の基礎となる原著]

**Characterization of the LP28 strain-specific exopolysaccharide biosynthetic gene cluster found in the whole circular genome of *Pediococcus pentosaceus***

Tetsuya Yasutake, Takanori Kumagai, Atsushi Inoue, Koei Kobayashi, Masafumi Noda, Asumi Orikiwa, Yasuyuki Matoba and Masanori Sugiyama, Characterization of the LP28 strain-specific exopolysaccharide biosynthetic gene cluster found in the whole circular genome of *Pediococcus pentosaceus*, *Biochemistry and Biophysics Reports* 5 (2016) 266-271

## [謝辞]

本研究の実施に対し，終始親身なるご指導とご鞭撻を受け賜りました，広島大学大学院医歯薬保健学研究院，薬学分野 杉山政則 教授に謹んで感謝の意を表します。

また，研究の遂行にあたって，常に有益なご指導と的確なご助言を受け賜りました，広島大学大学院医歯薬保健学研究院，熊谷孝則 准教授，的場康幸 准教授，野田正文 特任講師に厚く御礼申し上げます。

さらに，多大なご理解とご協力を受け賜りました Meiji Seika ファルマ（株）永里敏秋 執行役員，矢内耕二 バイオサイエンス研究所長に心より感謝の意を表しますと共に，精力的に実験に協力いただきました，バイオサイエンス研究所小林浩詠係長，井上敦 研究員，新田正和 研究員に心より御礼申し上げます。