

博士論文（要約）

バクテリアにおける

補酵素類生合成に関与する新規経路の解析

倉 都 将 宏

## 目次

序章	3
序-1. 概要	3
序-2. 背景	5
序-3. 本研究における目的	10
第1章 乳酸菌における新規一次代謝経路の探索	11
1-1. 序	11
1-2. 結果	13
1-2-1. 各菌株の培養予備検討	13
1-2-2. アミノ酸要求性評価結果 -全貌-	16
1-2-3. アミノ酸要求性評価結果 - <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> -	23
1-2-4. アミノ酸要求性評価結果 - <i>L. gasseri</i> , <i>L. brevis</i> -	28
1-2-5. 核酸系物質の要求性評価結果 -全貌-	30
1-2-6. 核酸系物質の要求性評価結果 - <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> -	37
1-2-7. 核酸系物質の要求性評価結果 - <i>L. gasseri</i> , <i>L. brevis</i> -	38
1-2-8. ビタミン要求性評価結果 -全貌-	39
1-2-9. ビタミン要求性評価結果 - <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> -	47
1-2-10. ビタミン要求性評価結果 - <i>L. gasseri</i> , <i>L. brevis</i> -	48
1-3. 考察	54
1-3-1. <i>Lactobacillus</i> 属 4 株における新規生合成経路の可能性	54
1-3-2. 生合成遺伝子の存在と相反した「要求性」	59
1-3-3. 乳酸菌ゲノムサイズと栄養要求性	60
第2章 新規葉酸生合成経路の解析	61
2-1. 序	61
2-2. 結果	63
2-2-1. <i>E. coli pabABC</i> 欠損株を利用した相補試験	63
2-2-2. LAF1336 発現検討	66
2-2-3. LAF1336 の基質及び生成物の同定	69
2-2-4. ショットガンクローニング	72
2-2-5. NE1434 の PABA 生合成への関与の検証	75
2-2-6. NE1434 の基質の探索	77
2-2-7. NE1434 オルソログの分布	81
2-3. 考察	84
第3章 新規メナキノン生合成経路における MqnA 及び MqnB の解析	86
3-1. 序	エラー! ブックマークが定義されていません。

3-2. 結果.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
3-2-1. メナキノン新規生合成経路遺伝子のオルソログ	エラー! ブックマークが定義されていません。
3-2-2. <i>T. thermophilus</i> における MqnA オルソログ機能解析	エラー! ブックマークが定義されていません。
3-2-3. MqnB オルソログの発現検討.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
3-2-4. MqnB オルソログの機能解析 (基質及び生成物の同定)	エラー! ブックマークが定義されていません。
3-2-5. aminodeoxyfutalosine のメナキノン生合成への関与	エラー! ブックマークが定義されていません。
3-2-6. <i>A. cellulolyticus</i> における MqnA オルソログ機能解析 -生成物探索-	エラー! ブックマークが定義されていません。
3-2-7. <i>A. cellulolyticus</i> における MqnA オルソログ機能解析 - <i>Corynebacterium glutamicum</i> を利用した <i>in vivo</i> 解析-	エラー! ブックマークが定義されていません。
3-3. 考察.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
総括及び展望.....	87
実験方法.....	90
参考文献.....	97
謝辞.....	107

## 序章

### 序-1. 概要

ゲノム解析に関する技術革新より、近年、多くの微生物のゲノム情報が明らかとなってきている。それらの恩恵を受けた新しい発見として、イソペンテニルニリン酸生合成に関わる MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate) 経路 (Takagi *et al.*, 2002) や、*Thermus thermophilus* において見出された AAA ( $\alpha$ -Aminoadipic acid) からのリジン新規生合成経路 (Nishiyama, 2004)、*Streptomyces coelicolor* において見出されたフタロシンを介したメナキノン新規生合成経路 (Hiratsuka *et al.*, 2008) 等を代表として挙げるができる。また、補酵素の生合成においては、ピリドキサールのピリジン環が、大腸菌では 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) と 3-amino-1-deoxyacetone-1-phosphate から 7 段階で生合成されるのに対し、枯草菌では、ribulose-phosphate、glyceraldehyde-phosphate、アンモニアから 1 つの酵素反応で生合成される (Begley, 2006)、NAD の生合成では、従来真核生物にしか存在しないと考えられていた tryptophan-kynurenine 経路がキサントモナス目やフラボバクテリウム目に存在することが明らかにされる等 (Lima *et al.*, 2009)、補酵素生合成の多様性が明らかになりつつある。これらの事例から、これまでに発見されていない新規生合成経路が他にも多く存在する可能性が期待されていた。

本研究においては、多くの栄養要求性を示す一方で、近年のゲノム解析によりゲノムサイズが数 Mbp 程度と比較的大きいことがわかった *Lactobacillus* 属を対象に、新規一次代謝経路 (アミノ酸、核酸系物質、ビタミン) の探索を行った。多くの場合、期待に反しゲノム情報と栄養要求性の結果は一致したが、*Lactobacillus fermentum* と *Lactobacillus reuteri* では、コリスミ酸から *p*-アミノ安息香酸 (PABA) を合成する遺伝子が存在しないにも関わらず PABA 要求性を示さなかった。その詳細を *in vitro* で検討した結果、*L. fermentum* において PABA が新規経路で生合成される可能性が示された (Kuratsu *et al.*, 2010)。更に、PABA 生合成に関与する既知経路上の *pabA*、*pabB*、*pabC* 欠損大腸菌を宿主に用い、新規経路を有すると推定され、かつ入手可能な *L. fermentum*、*Nitrosomonas eutropha* を DNA 供与体としてショットガンクローニングを行った結果、*N. eutropha* から pyrroloquinoline quinone (PQQ) synthase と弱い相同性を持ち、機能未知とアノテーションされている候補遺伝子を取得することができた。本遺伝子のオルソログは、同じく新規経路を持つと予想される *Chlamydia* では、他の葉酸生合成遺伝子と染色体上でクラスターを成していることから、PABA の生合成に関与する可能性が強く示唆された (Sato *et al.*, 2014)。不思議なことに、*L. fermentum* のゲノムデータベースには本遺伝子のオルソログは存在しなかった。この事実は、*L. fermentum* には既知経路や *N. eutropha* とは異なる第 3 の経路が存在する可能性を示唆する。葉酸生合成経路は、抗細菌性、抗寄生虫性薬のターゲットとして注目されており、*C. trachomatis* や *Neorickettsia sennetsu* が本

遺伝子のオルソログを持ち、動物細胞ではそのオルソログは見つかっていないため、病原菌に高い特異性を示す抗生物質のための魅力的なターゲットと考えられる。

また、本研究の中でメナキノン新規生合成経路の解析も行った。出発物質であるコリスミ酸からの初発反応の解析を試みた結果、その詳細を明らかにすることはできなかったが、フタロシンから DHFL が生成する反応に関して、*S. coelicolor*、*T. thermophilus*、*Acidthermus cellulolyticus*、*Helicobacter pylori* が有する各遺伝子の機能解析を行い、コリスミ酸から DHFL に至る経路に多様性がある（フタロシンの hypoxanthine 部位が adenine 部位となった Aminodeoxyfutasine (AFL) がその経路の中間に関与する場合がある）ことを明らかにすることができた (Arakawa *et al.*, 2011)。この中で、AFL が直接 DHFL に変換される経路は *Helicobacter pylori* のみが有しており、本反応の阻害剤が特異的抗ピロリ菌剤となる可能性が考えられる。

このように、本研究によって見出された PABA 新規経路の解析、またメナキノン生合成経路の更なる解析により、微生物の多様性や進化の面で新たな知見を得ることができ、更には応用面においても、ヒトにとって有用な抗生物質の開発への有力な手掛かりをも得ることができた。

## 序-2. 背景

1995年にインフルエンザ菌で全ゲノムが解読されて以来、今日に至るまで数多くの生物のゲノム解読が完了している。特に微生物に関しては、ヒト等に比べゲノムサイズが小さいことから、近年の次世代シーケンサーの発展に伴い、短時間で容易かつ安価に解析を行うことができるようになったため、急速にその数を増やしている。モデル微生物として研究がなされてきた大腸菌 *Escherichia coli* や酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、早くからそのゲノムデータベースが確立されたこともあり、それらの情報を元に様々な分野で研究が進められ、発展してきた。代謝経路に関しても、遺伝学的手法から逆遺伝学手法が主流となり、ゲノム情報を元に様々な新しい知見が蓄積されてきた。このような急速な技術の進歩の恩恵を受け、変異株等の解析を通し古くから蓄積されてきた情報と相まって、微生物の一次代謝経路はその大半が既に明らかとなっていると考えられる。現在では、その情報は、KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>) や BioCyc Database Collection (<http://biocyc.org/>) より容易に取り出すことが可能である。

しかしながら、ゲノム情報が蓄積されるにつれ、それまでの知見とは矛盾する事柄が明らかとなる場合もあるのも事実であり、メナキノン (MK) 生合成経路がその代表例である。MK はヒトにとっては血液凝固に必須なビタミンであり、また微生物では電子伝達系成分として生育に必要とされる (Cranenburg *et al.*, 2007; Bentley *et al.*, 1982; Meganathan, 2001)。大腸菌や枯草菌の MK 生合成経路は既に 1980 年代までに確立されており、シキミ酸経路からコリスミ酸が生成され、スクニシル安息香酸 ( $\alpha$ -succinylbenzoate: OSB) を経て MK が生成される経路が明らかにされていた。しかしながら、以下に記すようにグラム陽性細菌の放線菌において、MK が既知の経路とは異なる経路で生合成される可能性が見出された。

MK 新規経路の発見は、*Streptomyces argenteolus* A-2 株において産生されるテトラテルペノイド KS-505a の生合成遺伝子の取得に端を発した。その際、KS-505a の芳香環は OSB に由来することがトレーサー実験により明らかとなっていたこと、また放線菌では生理活性物質生合成遺伝子群は、通常染色体上でクラスターを成していることから、最初に OSB の生合成遺伝子を取得し、次いで周辺領域を解析する方法で KS-505a の全生合成遺伝子の取得が試みられた (Nakanishi *et al.*, 1992; Hayashi *et al.*, 2007)。ゲノム解析が終了していた放線菌、*Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002) と *Streptomyces avermitilis* (Omura *et al.*, 2001) から OSB の生合成に関与する *menF*、*menD*、*menC* 遺伝子が探索されたが、*menA* オルソログ (ナフトキノン骨格にプレニル側鎖を付加) と *menE* オルソログ (最終生合成ステップでメチル基を導入) は存在したものの、*menF* から *menB* に至る 5 つのオルソログは全く存在しなかった。更に、胃潰瘍・胃がんの原因菌として知られている *Helicobacter* 属細菌、食中毒原因菌として知られている *Campylobacter* 属細菌等の微生物においても、MK が生合成される

のにも関わらず *men* 遺伝子のオルソログが全く存在しなかった (Tomb *et al.*, 1997; Parkhill *et al.*, 2000)。このように KS-505a の研究に端を発し、一部の微生物では MK が全く新しい経路で生合成されると考えられ、その全容解明が試みられた結果、以下のようにその概略が明らかとなった (Seto *et al.*, 2008; Hiratsuka *et al.*, 2008)。

最初に、*S. coelicolor* において MK 新規生合成経路が動いているかを確認するため、トレーサー実験が行われた。具体的には、[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] glucose を添加して生育させた *S. coelicolor* 培養液を用いて、菌体から MK を抽出・精製して <sup>13</sup>C-NMR が行われ、MK 新規生合成経路の作動が確かめられた。続いて、新規経路に関する遺伝子・酵素群の同定が行われた。ゲノム解析が終了している微生物のうち、既知 MK 生合成経路を持つ大腸菌、枯草菌、結核菌、*Corynebacterium* 属細菌が共通して有しているオルソログの総当たり BLAST 解析が行われ、他方、新規経路を有すると考えられる *Helicobacter* 属、*Campylobacter* 属、*Thermus* 属、*Streptomyces* 属放線菌が共通に持つオルソログも同様に探索され、次いで後者に特異的に存在する遺伝子を選抜し、その中から ABC トランスポータや転写因子を除くことにより、最終的に *S. coelicolor* の SCO4506、SCO4326、SCO4327、SCO4550 が新規経路に関与する候補遺伝子として選抜された。

次にそれら遺伝子が実際に新規経路に関与することを実証するため、個々の候補遺伝子の破壊株が取得された。*S. coelicolor* は通常、ナフトキノン骨格に炭素数 40 のプレニル側鎖が付いた MK8 を生合成するが、SCO4506、SCO4326、SCO4327、SCO4550 の各破壊株からは MK8 は検出されず、破壊株選択のため培地に添加した MK4 のみ検出されたことから、それら 4 遺伝子が実際に新規経路に関与することが示された。更に、*S. coelicolor* を用いて NTG による MK 生合成欠損株の誘導及び相補遺伝子の取得が行われ、多くの変異株は先の 4 遺伝子で相補されたが、幾つかの変異株は、シキミ酸経路の遺伝子群であるコリスミ酸シンターゼ (SCO1496)、シキミ酸キナーゼ I (SCO1495)、3-デヒドロキナ酸シンターゼ (SCO1494) を含む ORF を持つプラスミドで相補されることがわかった。それらの変異株は、シキミ酸またはコリスミ酸のうち、コリスミ酸が添加された時のみ生育が回復することが示され、コリスミ酸シンターゼが触媒する反応 (5-O-(1-carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate → コリスミ酸+リン酸) は不可逆反応であるため、新規経路は既知経路と同様にコリスミ酸を出発基質とするが、その後は全く別の経路を経ることが予想された。

続いて、4 遺伝子破壊株において蓄積されると期待された生合成中間体の同定が試みられた。4 変異株を MK4 存在下で培養した後、添加した MK4 を有機溶媒で除去して残った水溶性画分を凍結乾燥した後に培地に添加し、他の 3 つの破壊株の生育が回復するか検討した結果、SCO4506 破壊株から調製した抽出物を添加した際、他の 3 株の生育は認められなかったが、残り 3 つの破壊株から調製した抽出物を加えた際は、少なくとも他の 1 つの破壊株の生育が認められたことから、これら破壊株培養液中に生合成中間体が蓄積していることが示された。このような方法を用いて、最終的に 4 つの遺伝子産物に関与する生合成上の相対位置

が SCO4506 → SCO4327 → SCO4550 → SCO4326 と決定された。更に、生合成中間体の同定、精製、構造決定が行われ、SCO4327 破壊株はフタロシンを、SCO4550 破壊株は de-hypoxanthine futalosine (DHFL) を、SCO4326 破壊株は DHFL が環化した cyclic DHFL を蓄積していることが LC-MS や NMR の結果より明らかとなった。

個々の酵素解析も進められており、SCO4506 についてはその反応は証明されていなかったが、SCO4327 については、それ自身を用いた場合はフタロシンを基質とした際に反応産物が検出されなかったが、*Thermus thermophilus* HB8 株におけるオルソログである TTHA0556 を用いた場合に、hypoxanthine 及び de-hypoxanthine futalosine (DHFL) が生成することが確認された。また SCO4550 について、*T. thermophilus* のオルソログ TTHA1092 と共に DHFL との反応が試みられ、radical SAM タンパク質と推定されていたため、嫌気条件下で酵素精製及び酵素反応を行われたが、cyclic DHFL の生成は認められていなかった。SCO4326 については、cyclic DHFL と反応させた結果、1, 4-naphthoquinone-6-carboxylic acid が生成することが LC-MS 解析により確認されていた。

本研究においては、それまで反応が証明されていなかった SCO4506 に代表される反応 (MqnA と命名)、及び SCO4327 に代表される反応 (MqnB と命名) について検証を行った。

乳酸菌は、古くから数多くの栄養要求性を示す微生物である。数多くの種が存在し、それらは多くの動物の口腔内や腸内において見出され、またチーズやヨーグルト等の発酵乳製品に商業的に利用されている。生成物として代表的な乳酸は、それら製品の pH の低下させる以外にも、他の微生物の生育を阻害する役割を担っている。乳酸菌の研究の方向性は、従来の工業的な利用（発酵食品への有効利用）に加え、近年ではプロバイオティクスやプレバイオティクスの考えに基づき、機能性食品、特定保健用食品、更には医療にも、その機能を応用しようという試みがなされている。このような背景の下、乳酸菌のゲノム解析が進められてきた。

乳酸菌の工業利用を考えた場合、当然ながらいかに低コストで乳酸菌を生育させ、高収率で最終産物を得るかが重要となる。しかし、乳酸菌は難培養性を示すものも多く、培地コストも高いと言われている。ゲノム情報が得られれば、適当な培地や培養条件の探索に応用できると期待される。異なる発酵型（絶対的ホモ発酵型、条件的ヘテロ発酵型、絶対的ヘテロ発酵型）を示す菌株のゲノム情報を基に、*Lactobacillus* 属の glucose 代謝経路に関わる遺伝子が比較された例では、絶対的ヘテロ発酵型 (*L. reuteri* JCM1112 株及び *L. fermentum* IFO3956 株、glucose から乳酸の他にアルコールや酢酸、炭酸ガス等の乳酸以外のものを同時に生成) では、6-phosphofructokinase の欠失により一般的な解糖系 (Embden-Meyerhof (EM) 経路) は機能しないが、ペントースリン酸 (PP) 経路の遺伝子群は完全に揃っていること、条件的ヘテロ発酵型 (*L. plantarum* WCFS1 株) では、EM 経路、PP 経路の両遺伝子群が揃っていることが明らかとされた。絶対的ホモ発酵型 (*L. johnsonii* NCC533 株及び *L. acidophilus* NCFM 株、glucose から乳酸のみを産生) では、EM 経路に加え、使われないと考えられていた PP 経路の



遺伝子群も揃っていることが確認された (Kleerebezem *et al.*, 2003; Pridmore *et al.*, 2004)。絶対的ホモ発酵型においても実際は酢酸やエタノールが生産されることが証明されたが、ヘテロ発酵型に比べると極微量しか産生されないことから、ホモ発酵型におけるペントースリン酸経路は何らかの制御を受けていると考えられている。上記の *Lactobacillus* 属 5 種についての COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) が比較された結果からは、*L. planterum* WCFS1 株のゲノムサイズは 3 Mbp を超え、他の 4 種は約 2 Mbp であり、ゲノムサイズと関連した ORF 数が示されている。*L. johnsonii* NCC 533 株と *L. acidophilus* NCFM 株はヒト腸管 (閉鎖環境) に由来するのに対し、*L. planterum* WCFS1 株は一般環境に由来した株であり、ORF 数の多さは多様な環境に対応するためであると考えられている。全ゲノム情報が明らかになれば、マイクロアレイ解析等によってどの遺伝子が発現し、機能しているかが明確になる。このように、ゲノム情報の解明は、これまで知られていた現象の根拠を示すと共に、これまでに知られていない側面を映し出すことを可能とする情報を提供し、更には培養条件やストレス反応を解析する上で非常に大きな役割を果たすと考えられる。

発酵食品中の乳酸菌の多くは、安全性の高い細菌 (generally recognized as safe (GRAS)) として利用されてきた。乳酸菌は、ヒトや動物の消化管に共生し、常在菌の一部として宿主の恒常性維持に貢献していると考えられている。このことから、プロバイオティクスとしての乳酸菌製剤や健康食品、また乳酸菌の消化管での増殖を特異的に促すプレバイオティクスと呼ばれる製剤や食品なども開発されている。このような観点から乳酸菌の安全性の確認は重要な案件だと考えられているが、一方で病原性細菌のゲノム解析が進み、ビルレンス遺伝子クラスターが水平伝播することが明らかにされてきた。

*Streptococcus thermophilus* は、ヨーグルト製造に利用され、安全性が認められている乳酸菌であるが、*S. thermophilus* と近縁の菌には、ヒトに対し毒性を示すものが多い。*S. thermophilus* の安全性を証明するために 2 菌株のゲノム解析が行われた結果、病原性を有する *Streptococcus* 属で、ビルレンス関連遺伝子等の有害な遺伝子を取り込んだと考えられる結果が報告されている (Bolotin *et al.*, 2004)。同じ球菌である *L. lactis subsp. lactis* や *Enterococcus faecalis* にも有害遺伝子を取り込まれていることが明らかとなっており、公開されている乳酸菌ゲノムの中には、望ましくない幾つかの遺伝子が発見されつつある。ゲノム情報のみからでは、それらの遺伝子が発現し、生体内で有害物質を作っているかどうかは不明であるが、ゲノム解析は安全と考えられる微生物に警鐘を鳴らす役割を担っていると考えられる。

近年、ゲノム情報に基づいて開発されたマイクロアレイ技術を用いたトランスクリプトーム解析も一般的になりつつある。乳酸菌の研究においても、*L. planterum* や *L. acidophilus* において、乳酸ストレス (Pieterse *et al.*, 2005)、二成分制御系センサー遺伝子の破壊の影響 (Azcarate-Peril *et al.*, 2005; Pfeiler *et al.*, 2007)、糖類の代謝 (Barrangou *et al.*, 2006) を調べる目的でマイクロアレイによる解析が報告されている。

上記以外にも、乳酸菌の有用機能を明確にし、ニュートリゲノミクスに対する乳酸菌側のゲノム情報提供のために、乳酸菌のゲノム解析は進められてきた。世界初の乳酸菌ゲノムは、

*Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 株でフランスのグループより報告された (Bolotin *et al.*, 2001)。その後、アメリカのグループを中心として、乳酸菌 9 種のゲノムが明らかとなり、現在までに乳酸菌ゲノム情報は急速に蓄積されつつある (Makarova *et al.*, 2006; Wegmann *et al.*, 2007; Kleerebezem *et al.*, 2003; Pridmore *et al.*, 2004; Altermann *et al.*, 2005; Chaillo *et al.*, 2005; van de Guchte *et al.*, 2006; Claesson *et al.*, 2006; Callanan *et al.*, 2008; Morita *et al.*, 2008; Azcarate-Peril *et al.*, 2008; Ojala *et al.*, 2010; Morita *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2010; Forde *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Kant *et al.*, 2011; Vogel *et al.*, 2011)。乳酸菌ゲノムは TCA 回路を構成する遺伝子の多くを欠失しているため、大腸菌等と比較して同量の糖から得られるエネルギー量が少ない。乳酸菌はエネルギー確保のため解糖系を駆使するが、溜まったピルビン酸を TCA 回路により消費できないため、ピルビン酸を乳酸へと変換し菌体外へ放出する。また、TCA 回路は一般に、アミノ酸生合成に必要な中間体の供給源となるが、乳酸菌ゲノム中には、アミノ酸合成に必要な中間体が合成されないためか、アミノ酸合成系の遺伝子の多くが欠失していることが多い。その代わり、アミノ酸を外部から獲得するため、ペプチダーゼやトランスポータなどをコードする遺伝子が多くゲノムに含まれている (Klaenhammer *et al.*, 2005)。

乳酸菌のゲノム情報は今や急速に集積されつつあり、今後も多くの乳酸菌および関連菌種のゲノム情報が蓄積され、乳酸菌の近縁菌種・菌株の比較ゲノムによる情報解析、ポストゲノムシーケンスの実験によって乳酸菌の持つ機能の特徴やその作用機序、ヒトの健康に有効な遺伝子について、さらに多くの知見が得られると予想されている (Morita *et al.*, 2007)。

その中で、栄養要求性の多い乳酸菌のゲノムサイズが、実は比較的大きいことがわかってきた。本研究においては *Lactobacillus* 属 5 株、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* を対象とし、それらが新規一次代謝経路を有している可能性を期待して、網羅的な栄養要求性評価、及びゲノムデータベースの精査を行い、比較解析を行った。

### 序-3. 本研究における目的

ゲノム解析が進み、数多くの微生物のゲノム情報が明らかとなり、またそのデータベースの整備も進んできた。その中で、モデル微生物においてこれまでに精査され、蓄積された情報から確立された一次代謝経路が、MK 新規経路に代表されるように、微生物の中でも一通りではないことが明らかとなってきている。本研究においては、栄養要求性が多いのにも関わらずゲノムサイズが比較的大きなことがわかった乳酸菌が、これまでに知られていない新規一次代謝経路を有していないかを検証すること、また既に新規経路が見出された MK 生合成経路をより詳細に解析することで、生理学的な新たな知見を獲得すること、また応用面において病原菌等に対する阻害剤の開発に繋がる経路や知見を見出すことを目的とした。

# 第1章 乳酸菌における新規一次代謝経路の探索

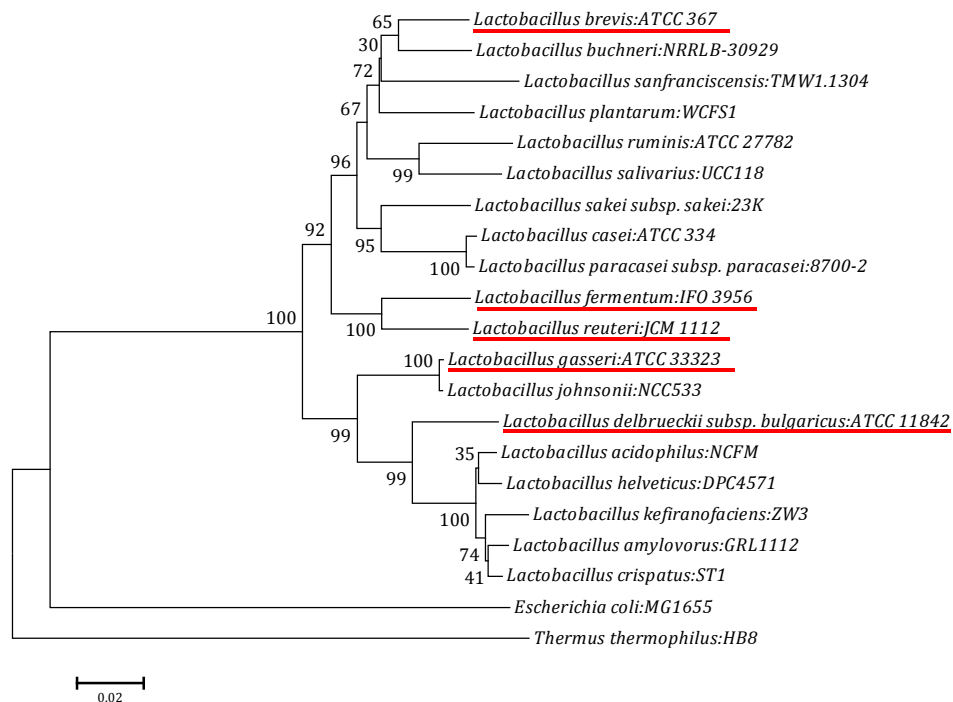
## 1-1. 序

乳酸菌 *Lactobacillus* 属は古くから数多くの栄養要求性が示されてきた微生物である。その一方で、近年のゲノム解析の結果から、それらのゲノムサイズは比較的大きいことがわかってきた (Table 1-1)。近年の目覚ましいシーケンス技術の発展と共に、これまでに *Lactobacillus plantarum* を筆頭として (Kleerebezem *et al.*, 2003) 数多くの *Lactobacillus* 属のゲノム解析が終了している (Pridmore *et al.*, 2004; Callanan *et al.*, 2008; Morita *et al.*, 2008; Azcarate-Peril *et al.*, 2008; Makarova *et al.*, 2006; van de Guchte *et al.*, 2006; Ojala *et al.*, 2010; Morita *et al.*, 2009; Altermann *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2010; Forde *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Chaillou *et al.*, 2005; Kant *et al.*, 2011; Vogel *et al.*, 2011; Claesson *et al.*, 2006)。そのため、ゲノムデータベースより、あらゆる代謝関連遺伝子のオルソログの有無について調べることが可能であり、それら既知の代謝経路と栄養要求性の簡単な比較解析を行った例も報告されている (Teusink *et al.*, 2005; Christiansen *et al.*, 2008)。しかしながら、新規生合成経路に可能性に着目して、網羅的かつ詳細な解析を行った報告例はこれまでに存在しない。

本章では、Table 1-1 及び Fig. 1-1 に示す *Lactobacillus* 属 5 株、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* を対象とし、それらが新規一次代謝経路を有している可能性を期待して、網羅的な栄養要求性評価、及びゲノムデータベース (KEGG 及び GIB (DDBJ) を利用) の精査を行い、比較解析を行った結果について記す。本研究に用いた *Lactobacillus* 属のゲノムサイズや総 ORF 数は、一次代謝産物の要求性の少ない *Thermus thermophilus* と比較してもほぼ同等であり、それにも関わらず *Lactobacillus* 属は数多くの栄養要求性を示すことが予想され、それらが新しい生合成経路を持つ可能性が十分に考えられた。なお、*L. reuteri*、*L. fermentum*、*L. delbrueckii* については既に一部の栄養要求性が調べられている報告例が存在したが、再調査による新たな発見を期待し、要求性調査を行った (Santos *et al.*, 2009; Ledesma *et al.*, 1977; Grobber *et al.*, 1998)。

**Table 1-1 The genome size of various *Lactobacilli***

Strain	Genome length (Mbp)	Total Genes
<i>Lactobacillus plantarum</i> [WCFS1]	3.35	3174
<i>Lactobacillus johnsonii</i> [NCC 533]	1.99	1918
<i>Lactobacillus helveticus</i> [DPC 4571]	2.08	1838
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i> [8700:2]	3.03	2890
<i>Lactobacillus crispatus</i> [ST1]	2.04	2097
<i>Lactobacillus casei</i> [ATCC 334]	2.92	2922
<i>Lactobacillus acidophilus</i> [NCFM]	1.99	1927
<i>Lactobacillus salivarius</i> [UCC118]	2.13	2182
<i>Lactobacillus ruminis</i> [ATCC 27782]	2.07	2054
<i>Lactobacillus buchneri</i> [NRRL B-30929]	2.59	2541
<i>Lactobacillus sakei</i> [23K]	1.88	1955
<i>Lactobacillus amylovorus</i> [GRL1112]	2.13	2193
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> [TMW 1.1304]	1.38	1519
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> [ZW3]	2.35	2222
<b><i>Lactobacillus fermentum</i> [IFO 3956]</b>	2.10	1912
<b><i>Lactobacillus reuteri</i> [JCM 1112]</b>	2.04	1901
<b><i>Lactobacillus gasseri</i> [ATCC 33323]</b>	1.89	1898
<b><i>Lactobacillus brevis</i> [ATCC 367]</b>	2.34	2351
<b><i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> [ATCC 11842]</b>	1.87	2184
<i>Escherichia coli</i> [K-12 substr. MG1655]	4.64	4497
<i>Thermus thermophilus</i> [HB8]	2.12	2245



**Fig. 1-1 Phylogenetic tree of *Lactobacilli***

The sequences of 16srRNAs of *Lactobacilli* were aligned using MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. The number on the tree indicate percentages from bootstrap sampling with 1000 replications. The analysis involved 21 nucleotide sequences and red underlines represent the *Lactobacilli* which were studied in this paper.

## 1-2. 結果

### 1-2-1. 各菌株の培養予備検討

栄養要求性評価に先立ち、*Lactobacillus* 属 5 株について培養予備試験を行った。富栄養培地での生育試験の結果、Table 1-2 に示したように *L. delbrueckii* を除く 4 株は MRS 培地を用いた液体培養（静置）にて良好な生育を確認できた。一方 *L. delbrueckii* については、MRS 培地及び NBRC (NITE Biological Resource Center) に記載のある培地 (No.803、Table 1-3) のどちらを使用しても、他菌株と比べプレート上でも液体培養でも著しい生育不良が認められた。*L. delbrueckii* は通性嫌気性細菌であり、酸素存在下でも活発に生育するとされているが、酸素による生育に対する悪影響を懸念して、プレートをビニールテープで覆う等の処置を施し酸素との接触をなるべく避けて培養を行ったが、同様に生育はほぼ認められなかった。

**Table 1-2 Growth on MRS medium of 5 *Lactobacilli***

Strain	Growth (37°C, 48 hrs)	
	[on plates]	[liquid culture] final OD <sub>600</sub>
<i>L. fermentum</i>	visible	7~9
<i>L. reuteri</i>	visible	6~7
<i>L. gasseri</i>	visible	5~6
<i>L. brevis</i>	visible	4~5
<i>L. delbrueckii</i>	invisible	0

**Table 1-3 The composition of MRS medium and NBRC 803 medium**

MRS		NBRC 803	
Composition	Concentration (g/L)	Composition	Concentration (g/L)
Peptone	10	Polypeptone	10
Meat extract	10		
Yeast extract	5	Yeast Extract	10
Glucose	20	Glucose	5
		Lactose	2
Tween 80	1	Tween80	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2		
Sodium acetate	5		
Diammonium hydrogencitrate	2		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1
MnSO <sub>4</sub> ·nH <sub>2</sub> O	0.05		
Agar (if needed)	15	Agar (if needed)	15
pH 6.0 - 6.5		pH 6.5 - 6.8	

続いて、合成培地を用いた生育試験を行った。特許（特開 2000-279166）を参考に Table 1-4 に示した組成の合成培地（LSP 培地と命名、Table 中のビタミン・核酸塩基類・アミノ酸類を全て補填）を用いて液体培養を行った結果、*L. delbrueckii* を除く 4 株については MRS 培地での生育には劣るものの、後の生育評価で生育可否を判断するのに十分な OD を示した（Fig. 1-2）。一方 *L. delbrueckii* については、MRS 培地の時と同様の生育不良を示した。更に文献（Chervaux *et al.*, 2000）を参考に他の合成培地（文献中の MPL 培地を改変、Table 1-5 にその組成を示した）、或いは MPL 培地の C 源をラクトースからフラクトース、マルトース、キシロース、ソルビトール、アラビノース、マンノース、ガラクトース、グリオキシル酸等に変えた培地においても、また培養温度を 30~42℃に変更しても、*L. delbrueckii* の生育はそれまでと同様にほぼ認められなかった（3 日間の培養で到達 OD が 0.5 未満、data not shown）。以上の結果より、*L. delbrueckii* の生育評価は中止せざるを得ず、その他 4 菌株（*L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. brevis*）について LSP 培地を用いて生育評価（栄養要求性評価）を進めることにした。

**Table 1-4 The composition of LSP medium**

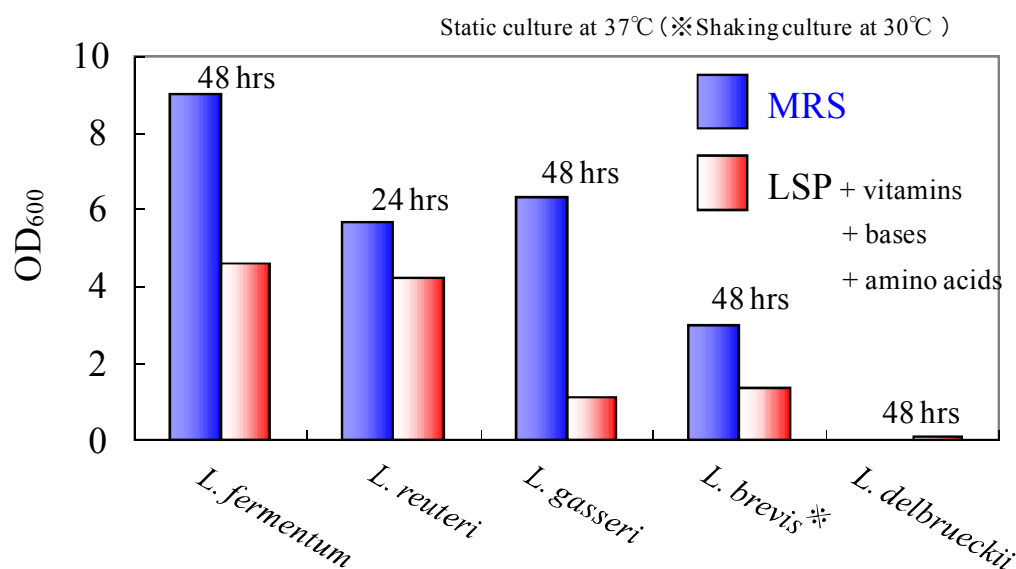
Composition1			Composition2			
Basic component	Glucose	20 g/L	Nucleobases	Adenine	50 mg/L	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.1 g/L		Guanine	50 mg/L	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g/L		Uridine	50 mg/L	
	Diammonium hydrogencitrate	2.0 g/L		Cytidine	50 mg/L	
	Potassium Acetate	10 g/L		Thymidine	50 mg/L	
	Calcium Lactate	1.0 g/L		Inosine	50 mg/L	
	NaCl	0.02 g/L		Xanthine	50 mg/L	
	Tween 80	1 g/L		Uracil	50 mg/L	
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g/L		Amino acids	Histidine	100 mg/L
	MnSO <sub>4</sub> ·nH <sub>2</sub> O	0.05 g/L			Serine	100 mg/L
	CoSO <sub>4</sub>	0.5 g/L			Cysteine	100 mg/L
Vitamins	Thiamine	100 mg/L	Glycine		100 mg/L	
	Nicotinate	1 mg/L	Alanine		100 mg/L	
	Calcium Pantothenate	1 mg/L	Valine		100 mg/L	
	Pyridoxal phosphate	1 mg/L	Leucine		100 mg/L	
	Pyridoxal hydrochloride	1 mg/L	Aspartate		100 mg/L	
	Pyridoxamine	5 mg/L	Asparagine		100 mg/L	
	Riboflavin	5 mg/L	Lysine		100 mg/L	
	Cobalamin	1 mg/L	Methionine		100 mg/L	
	<i>p</i> -Aminobenzoate	0.2 mg/L	Threonine	100 mg/L		
	Folic acid	0.2 mg/L	Isoleucine	100 mg/L		
	Inositol	10 mg/L	Tryptophan	100 mg/L		
	Ascorbic acid	500 mg/L	Tyrosine	100 mg/L		
	Biotin	1 mg/L	Phenylalanine	100 mg/L		
Lipoic acid	5 mg/L	Glutamate	100 mg/L			
		Glutamine	100 mg/L			
		Proline	100 mg/L			
		Arginine	100 mg/L			

pH 6.0 - 6.5

**Table 1-5 The composition of modified MPL medium**

Composition	Concentration	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.5	g/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7	g/L
Potassium Acetate	7.35	g/L
MnSO <sub>4</sub> · nH <sub>2</sub> O	0.02	g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.066	mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.0037	mg/L
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.007	mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.025	mg/L
CuSO <sub>4</sub>	0.016	mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · nH <sub>2</sub> O · 7H <sub>2</sub> O	0.0029	mg/L
Sodium Thioglycolate	0.5	g/L
Tween 80	1	g/L
Lactose	20	g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2	g/L
all amino acids	0.1	g/L
Adenine	0.05	g/L
Guanine	0.05	g/L
Xanthine	0.05	g/L
Uracil	0.05	g/L
Pyridoxal phosphate	1	mg/L
Calcium Pantothenate	1	mg/L
Riboflavin	1	mg/L
Nicotinate	1	mg/L
Cobalamin	1	mg/L
Folic acid	0.2	mg/L

pH 6.0



**Fig. 1-2 Growth assay of 5 Lactobacilli on LSP medium**

5 Lactobacilli: *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. brevis*, and *L. delbrueckii* were grown on MRS or LSP medium for 24 to 48 hours and OD600 was measured. Shaking culture at 30 °C was done for only *L. brevis*, because of its better growth than static culture. *L. delbrueckii* could not proliferate on MRS or LSP medium.



## 1-2-2. アミノ酸要求性評価結果 -全貌-

初めに *Lactobacillus* 属 4 株のアミノ酸要求性について評価を行った。各株について MRS 培地で前培養 (37°C 或いは 30°C で 1~2 日間液体培養) を行い、集菌・洗浄後、LSP 培地に植菌して 1~3 日間液体培養を行った。この際、LSP 培地より各アミノ酸を 1 つずつ除く Single-omission を行うことで栄養要求性を調査した。

各アミノ酸の生合成経路 (Fig. 1-3~1-8) のそれぞれの Step のオルソログの有無については Table 1-6~1-11 に示した通りであり、それらの情報と栄養要求性評価の結果を Table 1-12 にまとめた。オルソログに関しては、KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) の pathway 情報、及び KEGG サイト、DDBJ の GIB サイト (閉鎖中) が提供する Blast 検索 (BLASTP) を参考に精査した。BLASTP における検索元配列には *E. coli* K-12 MG1655 株の Protein Sequence を用い、それらに対する各オルソログの E-value を Table 1-6~1-11 に示した。

**Table 1-6 Orthologs for L-Histidine biosynthesis in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis		Orthologs (E-value)		
	<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
ATP phosphoribosyltransferase	<i>hisG</i>	LAF0756 (1e-11)	ND	ND	ND
phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	<i>hisI</i>	LAF0762 (4e-20) LAF0763 (6e-08)	ND	ND	ND
N-(5'-phospho-L-ribosyl-formimino)-5-amino-1-(5'-phosphoribosyl)-4-imidazolecarboxamide isomerase	<i>hisA</i>	LAF0760 (2e-28)	ND	ND	ND
imidazole glycerol phosphate synthase, subunit	<i>hisF</i>	LAF0761 (1e-60)	ND	ND	ND
imidazole glycerol phosphate synthase, subunit	<i>hisH</i>	LAF0759 (1e-30) LAF0753 (9e-20)	ND	ND	ND
imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	<i>hisB</i>	LAF0758 (2e-49)	ND	ND	ND
histidinol-phosphate aminotransferase	<i>hisC</i>	LAF0764 (5e-28)	LARI1611 (1e-17)	ND	LVIS2024 (7e-12)
histidinal dehydrogenase	<i>hisD</i>	LAF0757 (8e-88)	ND	ND	ND

ND: not determined

**Table 1-7 Orthologs for L-Serine, Glycine, and L-Cysteine biosynthesis in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis		Orthologs (E-value)		
	<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<i>serA</i>	LAF0769 (3e-35)	ND	LGAS0043 (6e-22)	ND
3-phosphoserine aminotransferase	<i>serC</i>	LAF0768 (1e-80)	ND	ND	ND
phosphoserine phosphatase	<i>serB</i>	ND	ND	ND	ND
L-serine deaminase	<i>tdcB</i>	ND	ND	ND	ND
L-serine deaminase	<i>tdcG</i>	ND	ND	ND	ND
L-serine deaminase	<i>sdaA</i>	ND	LARI020 (1e-27) LARI021 (4e-10)	ND	ND
L-serine deaminase	<i>sdaB</i>	ND	LARI020 (3e-26) LARI021 (3e-11)	ND	ND
serine hydroxymethyltransferase	<i>ghyA</i>	LAF0430 (e-134)	LAR0445 (e-129)	LGAS0256 (e-131)	LVIS1287 (e-126)
glycine decarboxylase	<i>gcvP</i>	ND	ND	ND	ND
glycine cleavage system H protein	<i>gcvH</i>	LAF0449 (1e-06)	LAR0463 (2e-16)	ND	LVIS1951 (2e-12) LVIS1271 (2e-12) LVIS1737 (7e-04)
aminomethyltransferase	<i>gcvT</i>	ND	ND	ND	ND
lipoamide dehydrogenase	<i>lpd</i>	LAF1137 (1e-91)	LAR0661 (7e-82)	LGAS1554 (2e-41)	LVIS1407 (4e-78)
serine acetyltransferase	<i>cysE</i>	LAF0855 (4e-07)	ND	ND	ND
cysteine synthase	<i>cysM</i>	LAF0346 (3e-49) LAF0974 (2e-32)	LARI677 (6e-54) LARI459 (1e-30)	ND	ND
cysteine synthase	<i>cysK</i>	LAF0346 (2e-65) LAF0974 (2e-37)	LARI677 (3e-67) LARI459 (2e-36)	ND	ND
L-cysteine desulhydrase	<i>metC</i>	LAF0973 (1e-47) LAF0814 (4e-41) LAF0815 (2e-37)	LAR0281 (2e-44)	ND	ND
L-cysteine desulhydrase	<i>tnaA</i>	ND	ND	ND	ND
L-cysteine desulhydrase	<i>malY</i>	LAF0942 (4e-56) LAF0785 (4e-68)	LARI793 (6e-64) LAR0583 (1e-64)	ND LGAS1191 (1e-65)	LVIS0300 (4e-59) LVIS1256 (1e-65)
cysteine desulfurase	<i>iscS</i>	LAF0489 (9e-63)	LAR0488 (3e-63) LAR0839 (6e-23)	LGAS1224 (4e-59)	LVIS1436 (3e-59)

ND: not determined

**Table 1-8 Orthologs for L-/D-Alanine, L-Valine, and L-Leucine biosynthesis in 4**

***Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>ivB</i>		LAF1022 (2e-56)	LAR0126 (9e-52)	LGAS1893 (2e-58)	LVIS0313 (1e-55) LVIS0491 (1e-52)
	<i>ivN</i>		ND	ND	ND	ND
Subunit of acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase	<i>ivG</i> (※)		LAF1022 (6e-54)	LAR0126 (6e-51)	LGAS1893 (1e-52)	LVIS0491 (1e-54) LVIS0313 (7e-47)
	<i>ivM</i>		ND	ND	ND	ND
	<i>ivI</i>		LAF1022 (7e-39)	LAR0126 (1e-44)	LGAS1893 (3e-49)	LVIS0313 (2e-50) LVIS0491 (1e-49)
	<i>ivH</i>		ND	ND	ND	ND
acetohydroxy acid isomeroeductase	<i>ivC</i>		ND	ND	ND	ND
dihydroxy acid dehydratase	<i>ivD</i>		ND	ND	ND	ND
branched-chain amino-acid aminotransferase	<i>ivE</i>		LAF0347 (2e-30) LAF0922 (6e-30)	ND	ND	ND
	<i>leuA</i>		ND	ND	ND	ND
2-isopropylmalate synthase	<i>leuC</i>		LAF0964 (e-141)	ND	ND	ND
Subunit of isopropylmalate isomerase	<i>leuD</i>		LAF0963 (6e-41)	ND	ND	ND
3-isopropylmalate dehydrogenase	<i>leuB</i>		LAF0965 (3e-78)	ND	ND	ND
leucine aminotransferase	<i>tyrB</i>		ND	ND	ND	ND
			LAF1051 (2e-38) LAF0031 (6e-27) LAF0859 (7e-27) LAF1103 (7e-27) LAF0136 (2e-26)	LAR0597 (2e-31) LARI133 (2e-31) LAR0041 (2e-29) LAR0715 (1e-24) LARI303 (1e-22)		LVIS0855 (2e-30) LVIS2024 (1e-20) LVIS2240 (5e-08) LVIS2087 (2e-07) LVIS2153 (3e-06)
glutamate-pyruvate aminotransferase	<i>alaA</i>		LAF0342 (2e-71) LAF0859 (5e-50) LAF0031 (3e-41) LAF0136 (3e-40) LAF1103 (2e-34)	LAR0337 (2e-74) LAR0715 (4e-44) LAR0597 (9e-44) LAR0041 (9e-42) LARI133 (2e-40)		LVIS0855 (2e-26) LVIS2024 (3e-14) LVIS2087 (4e-14) LVIS2240 (4e-13) LVIS2153 (4e-09)
	<i>alaC</i>		LAF1013 (1e-17) LAF0785 (4e-68) LAF0489 (9e-63)	LAR0299 (1e-17) LAR0583 (1e-64) LAR0488 (3e-63) LAR0839 (6e-23)	ND	LVIS2087 (1e-12) LVIS1256 (1e-65) LVIS1436 (3e-59)
valine-pyruvate aminotransferase	<i>avtA</i>		LAF1013 (1e-17) LAF0785 (4e-68) LAF0489 (9e-63)	LAR0299 (1e-17) LAR0583 (1e-64) LAR0488 (3e-63) LAR0839 (6e-23)	ND	LVIS2087 (1e-12) LVIS1256 (1e-65) LVIS1436 (3e-59)
cysteine desulfurase	<i>iscS</i>		LAF1013 (1e-17) LAF0785 (4e-68) LAF0489 (9e-63)	LAR0299 (1e-17) LAR0583 (1e-64) LAR0488 (3e-63) LAR0839 (6e-23)	ND	LVIS2087 (1e-12) LVIS1256 (1e-65) LVIS1436 (3e-59)
alanine racemase	<i>alr</i>		LAF0211 (3e-39)	LAR0245 (4e-36)	LGAS0267 (1e-32)	LVIS0508 (2e-39)
	<i>dadX</i>		LAF0211 (1e-39)	LAR0245 (4e-40)	LGAS0267 (5e-31)	LVIS0508 (8e-45)
D-amino acid dehydrogenase	<i>dadA</i>		ND	ND	ND	ND

※ *E. coli* B REL606

ND: not determined

**Table 1-9 Orthologs for L-Tryptophan, L-Phenylalanine, and L-Tyrosine biosynthesis in 4**

***Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase	<i>aroF</i>		ND	ND	ND	ND
	<i>aroH</i>		ND	ND	ND	ND
	<i>aroG</i>		ND	ND	ND	ND
3-dehydroquininate synthase	<i>aroB</i>		ND	ND	ND	ND
3-dehydroquininate dehydratase	<i>aroD</i>		ND	ND	ND	ND
shikimate dehydrogenase	<i>aroE</i>		ND	ND	ND	ND
	<i>ydiB</i>		ND	ND	ND	ND
shikimate kinase	<i>aroL</i>		LAF1104 (9e-08)	ND	ND	ND
	<i>aroK</i>		LAF1104 (3e-22)	ND	ND	ND
3-phosphoshikimate-1-carboxyvinyltransferase	<i>aroA</i>		LAF1106 (9e-26)	ND	ND	ND
chorismate synthase	<i>aroC</i>		LAF1108 (2e-42)	ND	ND	ND
anthranilate synthase component II	<i>trpD</i>		ND	ND	ND	ND
anthranilate synthase component I	<i>trpE</i>		ND	ND	ND	ND
indole-3-glycerol phosphate synthase / phosphoribosylanthranilate isomerase	<i>trpC</i>		ND	ND	ND	ND
tryptophan synthase, α subunit	<i>trpA</i>		ND	ND	ND	ND
tryptophan synthase, β subunit	<i>trpB</i>		ND	ND	ND	ND
tryptophanase	<i>tnaA</i>		ND	ND	ND	ND
chorismate mutase / prephenate dehydrogenase	<i>tyrA</i>		ND	ND	ND	ND
chorismate mutase / prephenate	<i>pheA</i>		ND	ND	ND	ND
phenylalanine transaminase	<i>ivE</i>		LAF0347 (2e-30) LAF0922 (6e-30)	ND	ND	ND
	<i>aspC</i>		LAF1051 (※) LAF1103 (※)	LAR0597 (※)	LGAS1128 (※)	LVIS0855 (※)
phenylalanine transaminase / tyrosine aminotransferase	<i>tryB</i>		ND	ND	ND	ND

ND: not determined

※ No hits in blast search but annotated genes are exist in genome database.

**Table 1-10 Orthologs for L-Aspartate, L-Asparagine, L-Lysine, L-Methionine, L-Threonine, and L-Isoleucine biosynthesis in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
aspartate aminotransferase	<i>aspC</i>	<i>LAF1051</i> (※1) <i>LAF1103</i> (※1)	<i>LAR0597</i> (※1)	<i>LGAS1128</i> (※1)	<i>LVIS0855</i> (※1)	
aspartate ammonia-lyase	<i>aspA</i>	ND	ND	ND	ND	
asparaginase	<i>iaaA</i>	ND	ND	<i>LGAS1433</i> (2e-24)	ND	
	<i>ansA</i>	ND	<i>LAR1782</i> (2e-45)	<i>LGAS0851</i> (3e-43)	<i>LVIS1836</i> (7e-16)	
	<i>ansB</i>	ND	<i>LAR1782</i> (2e-45)	<i>LGAS0851</i> (4e-17)	<i>LVIS1836</i> (2e-34)	
asparagine synthetase	<i>asnA</i>	<i>LAF1602</i> (1e-77)	<i>LAR1767</i> (5e-78)	<i>LGAS1786</i> (7e-80)	<i>LVIS1649</i> (7e-84)	
	<i>asnB</i>	<i>LAF0646</i> (6e-73) <i>LAF1836</i> (4e-36)	<i>LAR1814</i> (2e-38)	<i>LGAS0135</i> (2e-31)	<i>LVIS1501</i> (9e-40)	
	<i>fumA</i>	ND	ND	ND	ND	
fumarase	<i>fumB</i>	ND	ND	ND	ND	
	<i>fumC</i>	ND	<i>LAR1440</i> (※1)	<i>LGAS0847</i> (※1)	<i>LVIS0714</i> (※1)	
malate dehydrogenase	<i>mdh</i>	ND	ND	ND	ND	
malate:quinone oxidoreductase	<i>mgo</i>	ND	ND	ND	ND	
aspartate kinase	<i>lysC</i>	<i>LAF0853</i> (3e-21)	<i>LAR0591</i> (4e-27)	<i>LGAS1078</i> (4e-21)	ND	
aspartate kinase / homoserine dehydrogenase	<i>metL</i>	<i>LAF1145</i> (3e-16)	<i>LAR0591</i> (1e-12)	<i>LGAS1075</i> (7e-18) <i>LGAS1078</i> (6e-11)	ND	
aspartate kinase / homoserine dehydrogenase	<i>thrA</i>	<i>LAF0825</i> (4e-14)	<i>LAR0591</i> (6e-38)	<i>LGAS1078</i> (4e-36) <i>LGAS1075</i> (1e-16)	ND	
aspartate semialdehyde dehydrogenase	<i>asd</i>	<i>LAF0860</i> (4e-17)	<i>LAR0598</i> (1e-23)	<i>LGAS1777</i> (1e-21)	ND	
4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	<i>dapA</i>	<i>LAF0857</i> (3e-47)	<i>LAR0595</i> (2e-48)	ND	ND	
4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	<i>dapB</i>	<i>LAF0858</i> (5e-17)	<i>LAR0596</i> (9e-20)	ND	ND	
tetrahydrodipicolinate succinylase	<i>dapD</i>	<i>LAF0855</i> (1e-13)	<i>LAR0593</i> (2e-12)	ND	ND	
<i>N</i> -succinyl-diaminopimelate aminotransferase/ <i>N</i> -acetyldiaminopimelate aminotransferase	<i>argD</i>	<i>LAF0031</i> (※2) <i>LAF0136</i> (※2) <i>LAF0859</i> (※2)	<i>LAR0041</i> (※2) <i>LAR0597</i> (※2) <i>LAR0715</i> (※2) <i>LAR1133</i> (※2)	ND	ND	
<i>N</i> -succinyl-L-diaminopimelate desuccinylase/ <i>N</i> -acetyldiaminopimelate deacetylase	<i>dapE</i>	<i>LAF1015</i> (6e-24) <i>LAF0056</i> (2e-14) <i>LAF1349</i> (9e-13) <i>LAF0856</i> (※3)	<i>LAR0366</i> (2e-19) <i>LAR0181</i> (2e-15) <i>LAR1224</i> (2e-13) <i>LAR0594</i> (※3)	<i>LGAS0439</i> (4e-09) <i>LGAS1434</i> (1e-06) <i>LGAS1128</i> (※3)	<i>LVIS0864</i> (2e-25) <i>LVIS0192</i> (4e-22) <i>LVIS0253</i> (1e-20) <i>LVIS2269</i> (6e-19)	
diaminopimelate epimerase	<i>dapF</i>	<i>LAF0852</i> (1e-14)	<i>LAR0590</i> (2e-15)	ND	ND	
diaminopimelate decarboxylase	<i>lysA</i>	<i>LAF0854</i> (4e-38)	<i>LAR0592</i> (1e-40)	ND	ND	
homoserine <i>O</i> -succinyltransferase	<i>metA</i>	<i>LAF0826</i> (2e-41) <i>LAF0345</i> (1e-26)	<i>LAR1676</i> (1e-33)	ND	ND	
<i>O</i> -succinylhomoserine(thiol)-lyase / <i>O</i> -succinylhomoserine lyase	<i>metB</i>	<i>LAF0973</i> (9e-77) <i>LAF0814</i> (6e-69) <i>LAF0815</i> (4e-60)	<i>LAR0281</i> (3e-79)	ND	ND	
	<i>malY</i>	<i>LAF0942</i> (4e-56)	<i>LAR1793</i> (6e-64)	ND	<i>LVIS0300</i> (4e-59)	
	<i>metC</i>	<i>LAF0973</i> (1e-47) <i>LAF0814</i> (4e-41) <i>LAF0815</i> (2e-37)	<i>LAR0281</i> (2e-44)	ND	ND	
cystathionine β-lyase	<i>metE</i>	ND	<i>LAR1752</i> (7e-04) <i>LAR1028</i> (0.012)	ND	<i>LVIS0258</i> (4e-04)	
cobalamin-independent homocysteine transmethylase	<i>metH</i>	<i>LAF0828</i> (3e-15)	<i>LAR0993</i> (5e-11)	ND	ND	
cobalamin-dependent methionine synthase	<i>mmuM</i>	<i>LAF0828</i> (9e-73)	<i>LAR0993</i> (2e-73)	ND	ND	
homocysteine methyltransferase	<i>metK</i>	<i>LAF1358</i> (e-134)	<i>LAR1229</i> (e-134)	<i>LGAS0456</i> (e-137)	<i>LVIS1523</i> (e-138)	
homoserine kinase	<i>thrB</i>	<i>LAF1146</i> (1e-19)	ND	<i>LGAS1074</i> (6e-16)	<i>LVIS0548</i> (9e-14)	
threonine synthase	<i>thrC</i>	<i>LAF1144</i> (8e-45)	ND	<i>LGAS1076</i> (6e-47)	ND	
threonine deaminase	<i>ilvA</i>	ND	ND	ND	ND	
	<i>tdcB</i>	ND	ND	ND	ND	
	<i>ilvB</i>	<i>LAF1022</i> (2e-56)	<i>LAR0126</i> (9e-52)	<i>LGAS1893</i> (2e-58)	<i>LVIS0313</i> (1e-55) <i>LVIS0491</i> (1e-52)	
	<i>ilvN</i>	ND	ND	ND	ND	
	<i>ilvG</i> (※)	<i>LAF1022</i> (6e-54)	<i>LAR0126</i> (6e-51)	<i>LGAS1893</i> (1e-52)	<i>LVIS0491</i> (1e-54) <i>LVIS0313</i> (7e-47)	
Subunit of acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase	<i>ilvM</i>	ND	ND	ND	ND	
	<i>ilvI</i>	<i>LAF1022</i> (7e-39)	<i>LAR0126</i> (1e-44)	<i>LGAS1893</i> (3e-49)	<i>LVIS0313</i> (2e-50) <i>LVIS0491</i> (1e-49)	
	<i>ilvH</i>	ND	ND	ND	ND	
acetohydroxy acid isomerase	<i>ilvC</i>	ND	ND	ND	ND	
dihydroxy acid dehydratase	<i>ilvD</i>	ND	ND	ND	ND	
branched-chain amino-acid aminotransferase	<i>ilvE</i>	<i>LAF0347</i> (2e-30) <i>LAF0922</i> (6e-30)	ND	ND	ND	
threonine dehydrogenase	<i>tdh</i>	<i>LAF1827</i> (2e-29) <i>LAF0943</i> (1e-21)	<i>LAR1742</i> (6e-37)	ND	ND	
2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase	<i>kbl</i>	ND	ND	ND	ND	
threonine aldolase	<i>ltaE</i>	ND	ND	ND	ND	

ND: not determined

※1 No hits in blast search but annotated genes are exist in genome database.

※2 ArgD in *E. coli* catalyzes the amination of *N*-succinyl-2-amino-6-ketopimelate to yield *N*-succinyl-L,L-2,6-diaminopimelate, while asterisk-2 genes are annotated by the function of amination of *N*-acetyl-2-amino-6-ketopimelate to yield *N*-acetyl-L,L-2,6-diaminopimelate.

※3 DapE in *E. coli* catalyzes the deacylation of *N*-acetyl-L,L-2,6-diaminopimelate, while enzymes encoded by asterisk-3 genes are predicted to deacylate *N*-acetyl-L,L-2,6-diaminopimelate.

**Table 1-11 Orthologs for L-Glutamate, L-Glutamine, L-Proline, and L-Arginine biosynthesis in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)			
		<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>
glutamate dehydrogenase	<i>gdhA</i>	ND	ND	ND	ND
glutamate synthase, large subunit	<i>gltB</i>	ND	ND	ND	ND
glutamate synthase, small subunit	<i>gltD</i>	ND	ND	ND	ND
glutaminase	<i>ybaS</i>	ND	LAR1188 (2e-40)	LGAS0507 (4e-41)	ND
	<i>yneH</i>	ND	LAR0237 (4e-31)	LGAS0507 (3e-51)	ND
carbamoyl phosphate synthetase, subunit	<i>carA</i>	LAF1203 (6e-82)	LAR0081 (4e-82)	LGAS1088 (9e-79)	
		LAF0727 (7e-64)	LAR0076 (3e-57)	LGAS1013 (1e-37)	LVIS0830 (5e-64)
		LAF1162 (2e-62)			
carbamoyl phosphate synthetase, subunit	<i>carB</i>	LAF1202 (0.0)	LAR0080 (0.0)	LGAS1087 (0.0)	
		LAF0728 (0.0)	LAR0077 (7e-82)	LGAS1012 (e-118)	LVIS0829 (e-104)
		LAF1161 (1e-78)			
CTP synthase	<i>pyrG</i>	LAF0202 (e-168)	LAR0221 (e-173)	LGAS0226 (e-158)	LVIS0487 (e-166)
GMP synthetase	<i>guaA</i>	ND	LAR1510 (e-164)	LGAS0231 (e-161)	LVIS1759 (e-161)
asparagine synthetase	<i>asnB</i>	LAF0646 (6e-73)	LAR1814 (2e-38)	LGAS0135 (2e-31)	LVIS1501 (9e-40)
		LAF1836 (4e-36)			
glutamine synthetase	<i>glnA</i>	LAF1275 (2e-70)	LAR1135 (3e-76)	LGAS1379 (6e-66)	LVIS0990 (2e-82)
aspartate transaminase	<i>aspC</i>	LAF1051 (※1)	LAR0597 (※1)	LGAS1128 (※1)	LVIS0855 (※1)
		LAF1103 (※1)			
4-aminobutyrate aminotransferase	<i>puuE</i>	LAF1619 (2e-61)	LAR0189 (9e-64)	ND	ND
		<i>gabT</i>	LAF1619 (5e-58)	LAR0189 (8e-60)	ND
glutamate decarboxylase A	<i>gadA</i>	ND	ND	ND	LVIS1847 (e-109) LVIS0079 (5e-84)
glutamate decarboxylase B	<i>gadB</i>	ND	ND	ND	LVIS1847 (e-109) LVIS0079 (1e-84)
NAD <sup>+</sup> -dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>sad</i>	LAF0045 (4e-89)	LAR0033 (7e-94)	LGAS1626 (1e-85)	LVIS0323 (3e-85)
NADP <sup>+</sup> -dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	LAF0045 (4e-68)	LAR0033 (8e-70)	LGAS1626 (7e-62)	LVIS0323 (6e-61)
2-oxoglutarate decarboxylase, subunit	<i>sucA</i>	ND	ND	ND	ND
2-oxoglutarate decarboxylase, subunit	<i>sucB</i>	LAF1138 (2e-44)	LAR0610 (1e-51)	ND	LVIS1408 (4e-50)
lipamide dehydrogenase	<i>lpd</i>	LAF1137 (1e-91)	LAR0661 (7e-82)	LGAS1554 (2e-41)	LVIS1407 (4e-78)
succinyl-CoA synthetase, β subunit	<i>sucC</i>	ND	ND	ND	ND
succinyl-CoA synthetase, α subunit	<i>sucD</i>	ND	ND	ND	ND
glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase	<i>proA</i>	LAF1356 (e-109)	LAR0334 (e-102)	ND	ND
γ-glutamyl kinase	<i>proB</i>	LAF1357 (4e-41)	LAR0335 (8e-42)	ND	ND
pyrroline-5-carboxylate reductase	<i>proC</i>	LAF1394 (1e-30)	LAR0333 (1e-31)		
			LAR0032 (2e-25)	ND	LVIS0538 (2e-82)
proline dehydrogenase	<i>putA</i>	LAF0045 (2e-25)	LAR0333 (2e-26)	ND	ND
N-acetylglutamate synthase	<i>argA</i>	LAF0725 (※1, 3)	ND	ND	ND
acetylglutamate kinase	<i>argB</i>	LAF0724 (1e-14)	ND	ND	ND
N-acetylglutamylphosphate reductase	<i>argC</i>	LAF0726 (2e-42)	ND	ND	ND
		LAF0723 (7e-61)	LAR0041 (※2)		
		LAF0031 (※2)	LAR0597 (※2)		
acetylornithine aminotransferase	<i>argD</i>	LAF0136 (※2)	LAR0715 (※2)	ND	ND
		LAF0859 (※2)	LAR1133 (※2)		
		LAF0056 (3e-25)	LAR0181 (1e-24)	LGAS0439 (5e-09)	LVIS0864 (8e-29)
acetylornithine deacetylase	<i>argE</i>	LAF1015 (4e-25)	LAR0366 (5e-19)	LGAS1434 (1e-04)	LVIS0192 (1e-22)
		LAF0725 (※3)	LAR1224 (3e-08)		
ornithine carbamoyltransferase chain F	<i>argF</i>	LAF0298 (e-110)	LAR0419 (e-106)	ND	LVIS2026 (9e-86)
ornithine carbamoyltransferase chain I	<i>argI</i>	LAF0298 (e-105)	LAR0419 (e-104)	ND	LVIS2026 (4e-86)
argininosuccinate synthase	<i>argG</i>	LAF1625 (7e-24)	LAR0702 (2e-27)	ND	ND
argininosuccinate lyase	<i>argH</i>	LAF1625 (e-110)	LAR0703 (e-118)	ND	ND
arginine deiminase	ND (※4)	LAF0300 (※4)	LAR0435 (※4)	ND	LVIS2027 (※4)

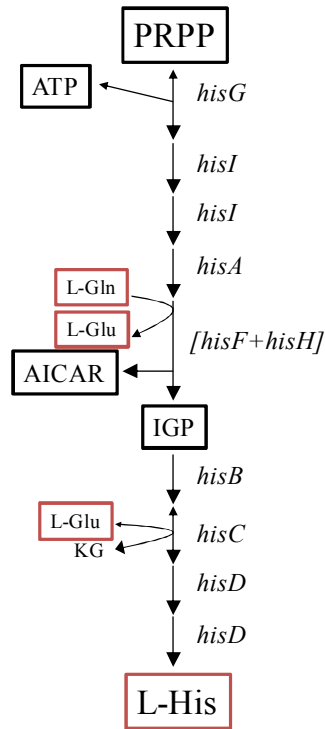
ND : not determined

※1 No hits in blast search but annotated genes are exist in genome database.

※2 cf. Table 1-10 ※2

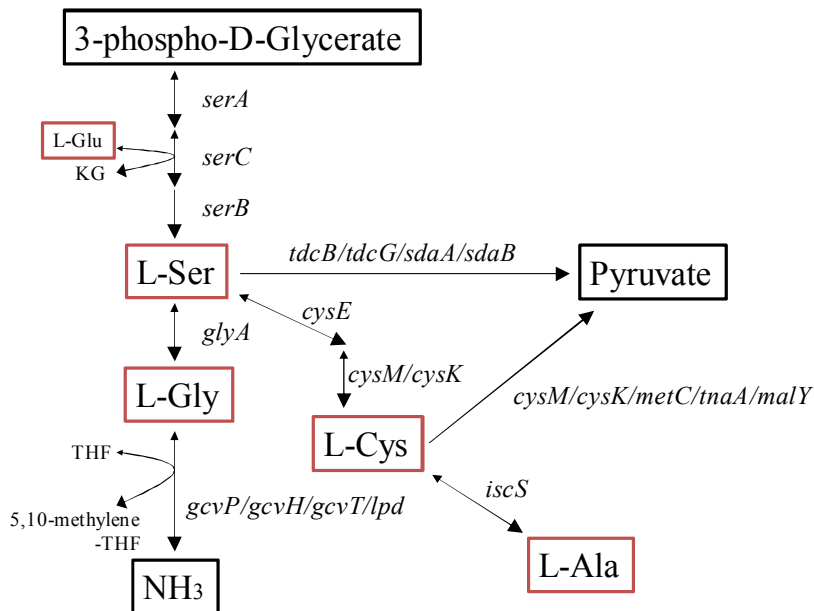
※3 LAF0725 is annotated as bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase protein

※4 *E. coli* has no orthologs of arginine deiminase, while 3 *Lactobacilli* have those correspondences.



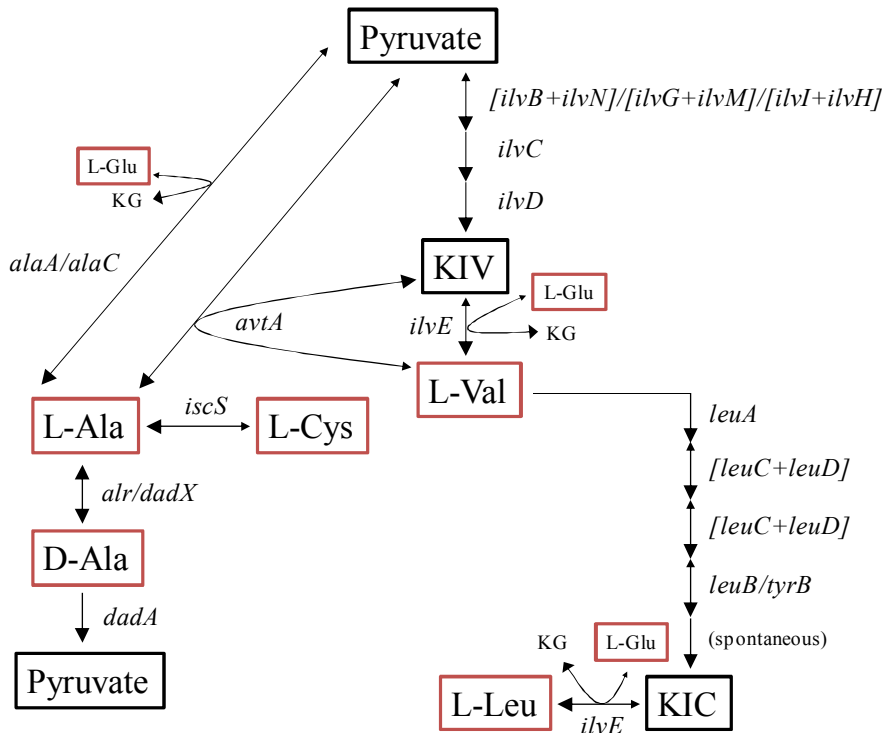
**Fig. 1-3 The biosynthetic pathway for L-Histidine in *E. coli***

Abbreviation: PRPP, 5-phospho- $\alpha$ -D-ribose 1-diphosphate; AICAR, 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl) imidazole-4-carboxamide; IGP, D-erythro-imidazole-glycerol-phosphate; KG, 2-oxoglutarate.



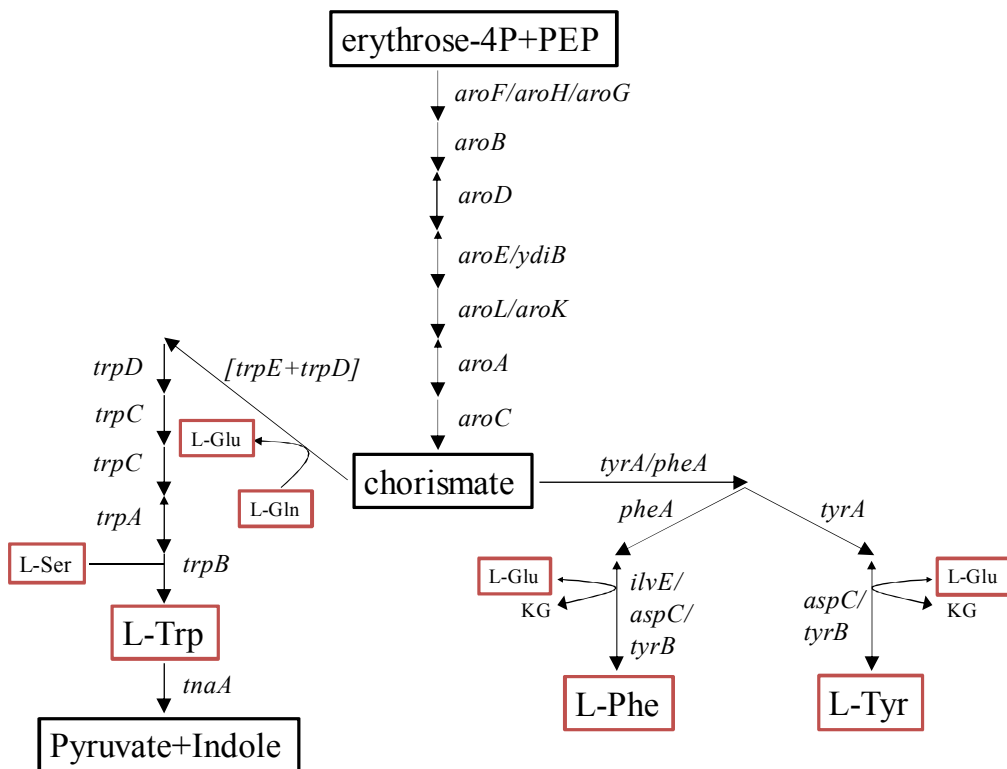
**Fig. 1-4 The biosynthetic pathway for L-Serine, Glycine, and L-Cysteine in *E. coli***

Abbreviation : KG, 2-oxoglutarate; THF, tetrahydrofolate.



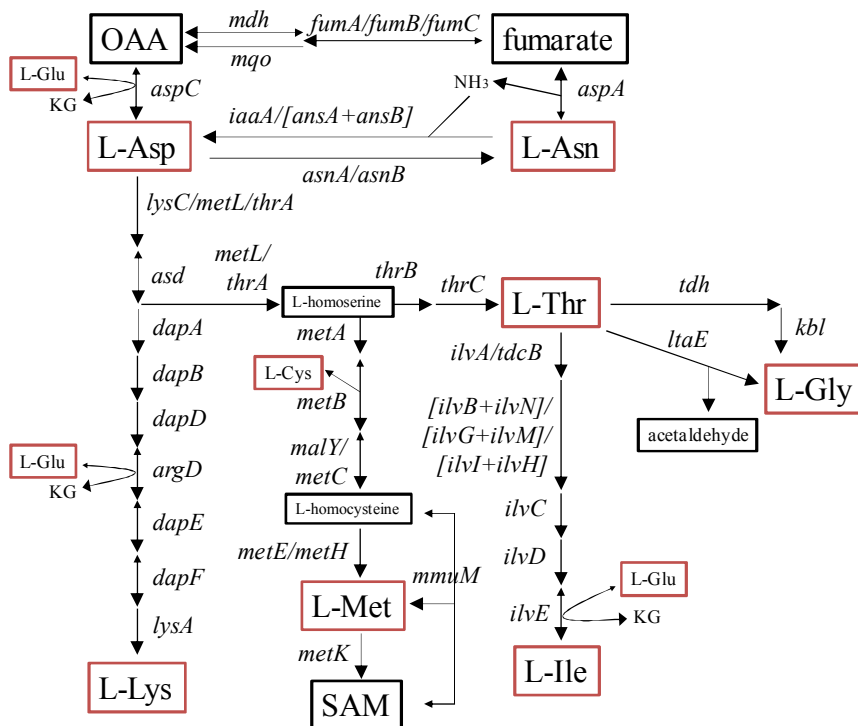
**Fig. 1-5 The biosynthetic pathway for L-/D-Alanine, L-Valine, and L-Leucine in *E. coli***

Abbreviation : KG, 2-oxoglutarate; KIV, 3-methyl-2-oxobutanoate; KIC, 4-methyl-2-oxopentanoate.



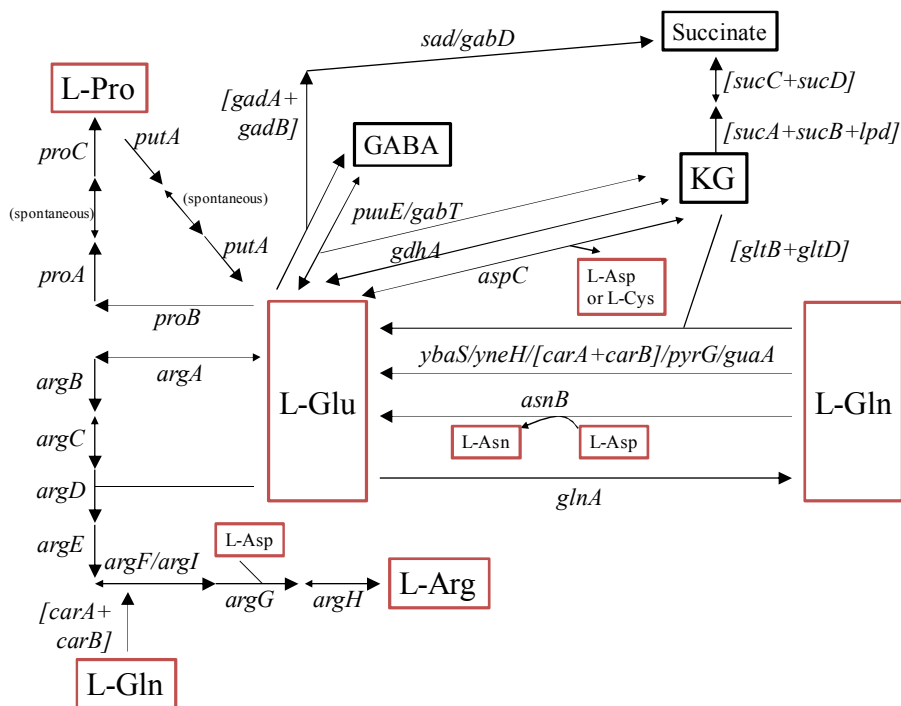
**Fig. 1-6 The biosynthetic pathway for L-Tryptophan, L-Phenylalanine, and L-Tyrosine in *E. coli***

Abbreviation : KG, 2-oxoglutarate; erythrose-4P, D-erythrose 4-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate.



**Fig. 1-7 The biosynthetic pathway for L-Aspartate, L-Asparagine, L-Lysine, L-Methionine, L-Threonine, and L-Isoleucine in *E. coli***

Abbreviation : KG, 2-oxoglutarate; OAA, oxaloacetate; SAM, S-adenosyl-L-methionine.



**Fig. 1-8 The biosynthetic pathway for L-Glutamate, L-Glutamine, L-Proline, and L-Arginine in *E. coli***

Abbreviation : KG, 2-oxoglutarate; GABA, 4-aminobutyrate.

**Table 1-12 The summary of the assay of amino acids auxotrophy and the information of genome database in 4 *Lactobacilli***

Omitted Amino acids	<i>L. fermentum</i>		<i>L. reuteri</i>		<i>L. gasseri</i>		<i>L. brevis</i>	
	growth test	database	growth	database	growth	database	growth	database
L-Histidine	V	possible	N	impossible	N	impossible	N	impossible
L-Serine	V	possible	N	impossible	N	impossible	N	impossible
L-Cysteine	V	possible	V	possible	N	impossible	N	impossible
Glycine	V	possible	V	possible	<u>N</u>	<b>possible</b>	<u>N</u>	<b>possible</b>
L-/D-Alanine	V	possible	V	possible	V	possible	V	possible
L-Valine	N	impossible	N	impossible	N	impossible	N	impossible
L-Leucine	N	impossible	N	impossible	N	impossible	N	impossible
L-Tryptophan	N	impossible	N	impossible	N	impossible	N	impossible
L-Tyrosine	N	impossible	N	impossible	N	impossible	N	impossible
L-Phenylalanine	N	impossible	N	impossible	N	impossible	N	impossible
L-Aspartate	V	possible	V	possible	V	possible	V	possible
L-Asparagine	V	possible	V	possible	V	possible	V	possible
L-Lysine	V	possible	V	possible	N	impossible	N	impossible
L-Methionine	<u>N</u>	<b>possible</b>	<u>N</u>	<b>possible</b>	N	impossible	N	impossible
L-Threonine	<u>N</u>	<b>possible</b>	N	impossible	N	impossible	N	impossible
L-Isoleucine	N	impossible	N	impossible	N	impossible	N	impossible
L-Glutamate	V	possible	V	possible	V	possible	N	impossible
L-Glutamine	V	possible	V	possible	V	possible	V	possible
L-Proline	V	possible	V	possible	N	impossible	N	impossible
L-Arginine	N	impossible	N	impossible	N	impossible	N	impossible

※1 The results of growth tests were represented by the following abbreviation: V, viable; N, nonviable.

※2 The case that all genes required for biosynthesis of an amino acid are exist in genome database is represented by "possible", while the case that more than one gene are missig is represented by "impossible".

※3 Bold and underlined type represent the discrepancy between the results of growth test and the information in genome database.

Table 1-12 に示したように、結論としては、栄養要求性評価の結果とゲノムデータベースの結果はほぼすり合う形となった。以下に、ゲノムデータベースと要求性評価が矛盾した結果について菌株ごとに記述した。「あるアミノ酸について、ゲノムデータベース上では生合成遺伝子が揃っていないのに対し、そのアミノ酸は非要求性である」という新規経路の可能性が伺える結果はほぼないと考えられたが、逆にゲノム上に遺伝子が揃っているのにも関わらず、そのものの要求性を示してしまう結果はいくつか存在した。

### 1-2-3. アミノ酸要求性評価結果 - *L. fermentum*, *L. reuteri* - メチオニン、スレオニン、リジン

Table 1-12 に示すように、メチオニンについて、*L. fermentum* 及び *L. reuteri* は生合成に必要な遺伝子のセットを備えているが要求性を示した。両者について、メチオニン非含有培地に homoserine 或いはメチオニンの前駆体である homocysteine を 0.8 g/L の濃度で添加し生育評価を行ったが、生育は認められなかったことから、homocysteine からメチオニンの経路を担う *LAF0828* や *LAR0993* が pseudogene である、または別の機能を持つ遺伝子である可能性が考えられたが、homocysteine や homoserine 自体の安定性や細胞内への取り込みの問題も考えられ、結論は導き出せなかった。

また、*L. fermentum* に関してはスレオニンについても同様に生合成遺伝子のセットを備えて



いるが要求性を示した。メチオニン要求性及びスレオニン要求性を示すこと、またリジンについては非要求性であることから、*metL* のオルソログ : *LAF1145*、及び *thrA* のオルソログ : *LAF0825* は aspartate kinase 活性は持つが、homoserine dehydrogenase 活性は持たないか、または非常に弱いのかかもしれない。一方で、スレオニン非含有培地に homoserine を 0.8 g/L の濃度で添加し生育評価を行ったが生育は認められなかったため、*thrB* のオルソログ : *LAF1146* 及び *thrC* のオルソログ : *LAF1144* が機能を失った pseudogene、または別の機能を有する遺伝子である可能性が考えられたが、メチオニンの時と同様、homoserine 自体の安定性や取り込みの問題で結論は不明である。

上記の結果を裏付けるために各オルソログの機能を確かめる必要はあるが、別の考え方として、アスパラギン酸からリジン、スレオニン、メチオニンに至る経路は、Fig. 1-7 に示すように複数の経路が重複していることとの関連性も考えるべきである。*E. coli* において、各アミノ酸は、それらの生合成経路の上流にてフィードバック阻害を引き起こす。代表例として、リジンは *lysC* を、スレオニンは *thrA*、*thrB* を、メチオニンは *metA* を阻害することが知られている。それらが *L. fermentum* や *L. reuteri* にも当てはまるとすれば、メチオニンを含まない培地においてもスレオニンやリジンにより上流が阻害 (*lysC* オルソログ : *LAF0853*、*metL* オルソログ : *LAF1145*、*thrA* オルソログ : *LAF0825*) されるため、メチオニン生合成遺伝子を備えていてもメチオニン要求性を示した可能性が考えられる。また、*L. fermentum* がスレオニン要求性を示した結果も同様で、メチオニンやリジンによる aspartate kinase の阻害が影響している可能性が考えられる。リジンに関して要求性を示さなかったのは、aspartate kinase 活性を有するとされる酵素群の中で、*lysC* オルソログである *LAF0853* の産物が主として機能しているためと考えることができる。実際、ゲノムデータベース上で aspartate kinase とアノテーションされているものは *LAF0853* のみで、*LAF1145* 及び *LAF0825* は homoserine dehydrogenase とアノテーションされており、培地中にリジンが含まれる際は aspartate kinase は働かず、スレオニンもメチオニンも生合成できないと考えられる。また *L. reuteri* に関しては aspartate kinase として存在するのは *LAR0591* のみであり、その産物がリジンやスレオニンによってフィードバック阻害を受ける可能性が考えられる。しかしながら、上述のようにメチオニン非含有培地に homoserine や homocysteine を補填しても生育しなかった現象については、*E. coli* の生合成経路から推測するフィードバック阻害と関連付けることはできない。

### グルタミン酸・グルタミン

Table 1-11 及び Fig. 1-8 に示すように、*L. fermentum* において、一般的にグルタミン酸を生合成する主要な経路と考えられる、2-oxoglutarate よりグルタミン酸を生合成するグルタミン酸デヒドロゲナーゼのオルソログ、及びグルタミンよりグルタミン酸を生合成するグルタミンナーゼやグルタミン酸合成酵素のオルソログは、ゲノムデータベース上には存在しない。しかし、*L. fermentum* は、グルタミン酸非含有培地においてもコントロールと同等の生育を示した。プロリンからの分解経路 (*putA* オルソログである *LAF0045*) の存在が寄与している可能性が考えられたが、グルタミン酸、グルタミンの両方を加えない培地では生育しなかった(data

not shown) ため、その寄与は弱いと考えられる。グルタミン酸のみを加えない培地では、積極的なグルタミン酸生合成は行われないが、*carA+carB*、*pyrG*、*aspC* のオルソログが存在 (Table 1-11) するため、核酸類の生合成経路やヒスチジン・アスパラギン生合成経路でグルタミンがグルタミン酸に変換されることでグルタミン酸が補われ、更にはプロリンからの分解も少ないながらも寄与することで生育が可能になったのではと推察される。一方でグルタミン酸の新規経路の可能性や *glnA* オルソログがグルタミン酸とグルタミンの相互変換できることも期待された。そのため *glnA* オルソログ LAF1275 (膜タンパク) の精製及び *in vitro* での評価を試みたが、系を構築できず中断した (発現株を造成し、発現までは確認 (data not shown))。

### セリン・システイン

最後に、*L. fermentum* のセリン・システインの結果について記す。Table 1-12 に示すようにセリン非要求性、システイン非要求性であったが、セリンとシステインをいずれも含まない培地では生育が認められなかった (data not shown)。セリン生合成については、セリン及びシステイン非存在下で 3-phospho-serine (セリン前駆体) を添加すると生育した (data not shown) ことから、*serB* オルソログは存在しないものの、他の phosphatase が機能しセリンの生合成に寄与していると考えられた。*serA*・*serC* のオルソログとして LAF0769・LAF0768 が存在し、また Ser を含まない培地よりビタミン B6 類を除くと OD が 1~2 割程度に低下する (aminotransferase とされる LAF0768 の活性が低下したと推察、つまりは LAF0768 の機能が伺える) 点より、おそらく *L. fermentum* は Fig. 1-4 に示すように 3-phospho-D-Glycerate からセリンを生合成する経路を有していると推測される。システイン生合成については、セリンから生合成される経路 (*cysE*、*cysM*、*cysK* の各オルソログが存在、Table 1-7) が存在し、更には、主流ではないと考えられるが、システインが cysteine desulfurase の逆反応により L-Ala から生合成される可能性 (*iscS* オルソログ、Table 1-8 及び Fig. 1-4) や、*mmuM* オルソログ:LAF0828 によりメチオニンから生じるであろう L-homocysteine が、cystathionine  $\beta$ -lyase や cystathionine  $\gamma$ -lyase を介してシステインに変換される可能性 (*metB* オルソログや *malY/metC* オルソログ、Table 1-10 及び Fig. 1-7) を、ゲノムデータベースより伺うことができる。

セリン・システインを除くと生育しない理由に関しては明確な答えは出せないが、乳酸菌は一般に外界のアミノ酸等を利用して生存していることを踏まえ、以下のように考察 (仮説) した。

「*L. fermentum* は D-glycerate 3-phosphate からセリンを生合成する *de novo* 経路を、またピルビン酸やオキサロ酢酸からシステインを生合成する *de novo* 経路を持つが、いずれか、或いはいずれもその流れが弱く、実際にはセリン $\leftrightarrow$ システインの相互変換の寄与が大きい。セリンもシステインもない場合、どちらかのアミノ酸について生育に十分な量を生合成することができない。」

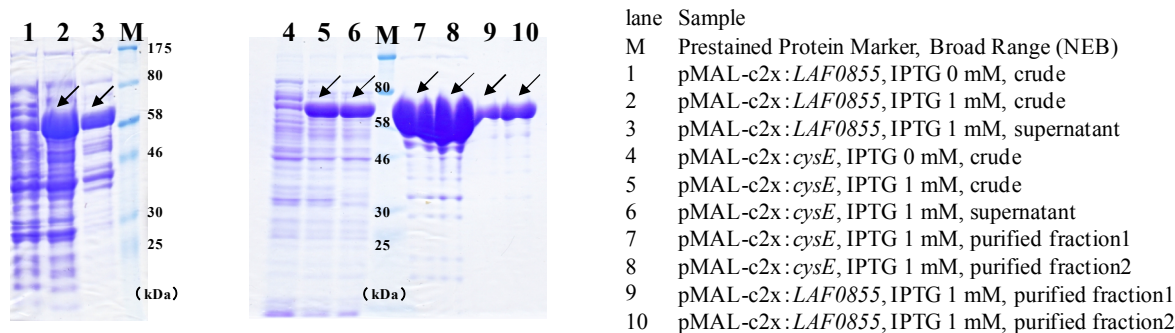
しかしながら、*cysE* オルソログとして挙げている LAF0855 は *cysE* との相同性が低く (Table 1-7)、ゲノムデータベースでは他の機能を持つ遺伝子 (tetrahydrodipicolinate N-acetyltransferase、*dapD* オルソログ、Table 1-10) とアノテーションされている。リジンについては、生育評価

の結果とゲノムデータベースとの整合性は取れている (Table 1-12) ため、LAF0855 がリジンの生合成に必要とされている可能性は高い。LAF0855 は *dapD* との相同性も高いとは言い難いが、その理由として、*E. coli* の場合は DapD が succinyl-CoA を用いて tetrahydrodipicolinate をスクシニル化するのに対し、LAF0855 は acetyl-CoA を用いてアセチル化すると予想されており、その違いが相同性の低さを反映していることが考えられる。

LAF0855 の産物が、実際に L-serine + acetyl-CoA  $\rightleftharpoons$  O-acetyl-L-serine + CoA の反応を担っているかどうかを確認する目的で CysE 及び LAF0855 の精製タンパクを取得し、酵素反応を行った。構築した発現株を Table 1-13 に、SDS-PAGE の結果を Fig. 1-9 に示した。2通りの宿主・ベクター系を試したが、いずれの場合も期待した通り可溶画分において発現が認められたため、それらのうち宿主に TB-1、ベクターに pMAL-c2x を使用した株を用いて、N末端に MBP (Maltose Binding Protein) が付加された各融合タンパクの精製酵素を取得した (Fig. 1-9)。取得した精製酵素を用いて 1 mM セリン、1 mM アセチル CoA、50 mM Tris-HCl (pH 6.5) 存在下で、100  $\mu$ l、37°C、12 時間の酵素反応を行った結果、HPLC 分析にてアセチル CoA のピークの減少並びに CoA ピークの出現が確認された (Fig. 1-9)。これらの結果より、LAF0855 がセリンのアセチル化を担う可能性が示唆されたが、反応後のサンプルについてアミノ酸分析を行った結果、LAF0855 との反応産物として O-acetyl-L-serine の生成は認められなかった。また、O-acetyl-L-serine と CoA からの逆反応も確認することができなかった (data not shown)。LAF0855 がセリンに対し acetyltransferase 活性を示すかどうかは不明のままであり、今後更なる検証が必要である。

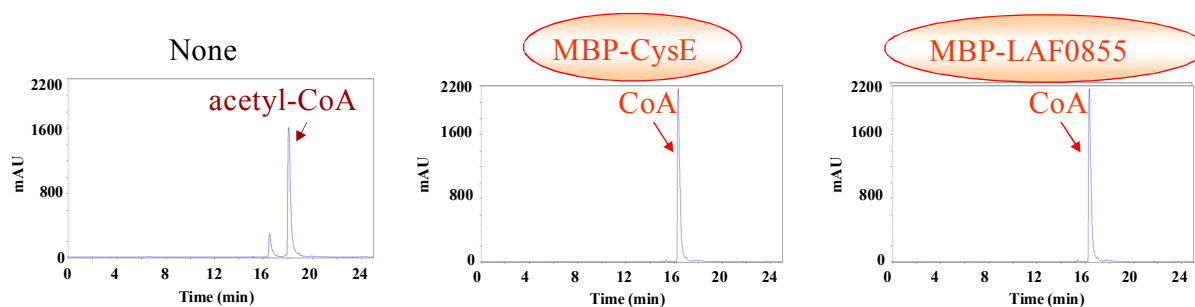
**Table 1-13 Strains for the expression of CysE and LAF0855**

Target	Expression vector	Host	The result of expression [fraction]
<i>cysE</i>	pQE-30	M15[pREP4]	OK [supernatant]
	pMAL-c2x	TB1	OK [supernatant]
LAF0855	pQE-30	M15[pREP4]	OK [supernatant]
	pMAL-c2x	TB1	OK [supernatant]



**Fig. 1-9 The expression of CysE and LAF0855 using pMAL-c2x**

The indicated constructs were transformed individually into TB1. Cultures were grown in LB plus glucose at 37°C to an OD600 about 0.5. Target protein expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 1 mM. Cultures were continued at 30°C and harvested by centrifugation between 4 and 8 hours after induction. Lysates were produced by sonication (crude samples) and centrifuged to obtain supernatant, followed by purification of MBP-tagged protein by Amylose resin (NEB). Approximately molecular weights of CysE, LAF0855, and MBP are 29.3 kDa, 24.7 kDa, and 42.5 kDa, respectively.



**Fig. 1-10 HPLC analysis of the reaction with recombinant CysE and LAF0855**

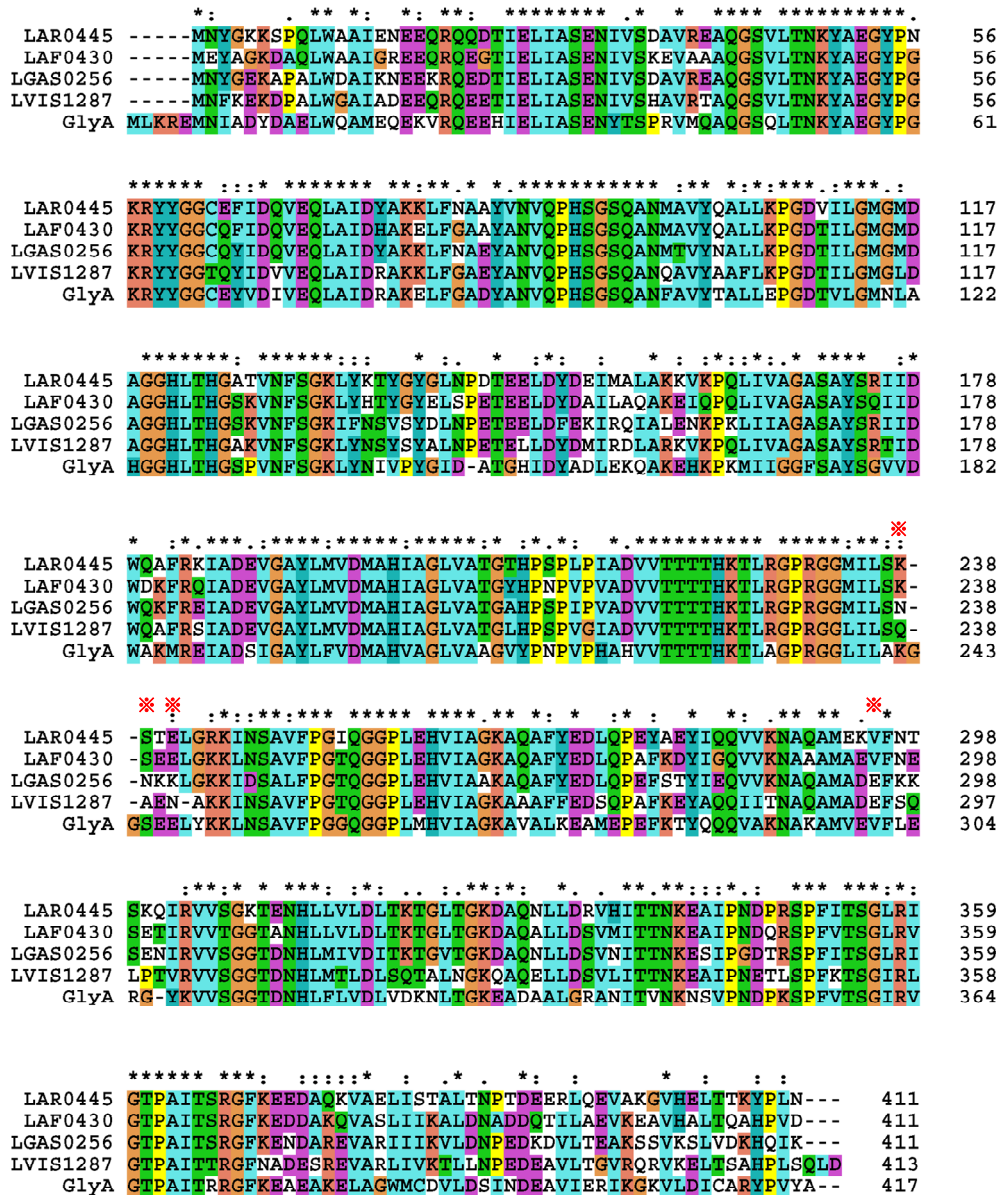
A reaction mixture (100  $\mu$ l) containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5), 1 mM L-Serine, 1mM Acetyl-CoA and 4 to 10  $\mu$ g of the purified recombinant enzyme was incubated at 37°C for 12 hours. The reaction product was subjected to HPLC analysis. The analytical conditions were as follows: Merck Mightisil RP-18GP Aqua column (250  $\times$  4.6 mm); temperature, 30°C; detection, 230 nm; mobile phase, 20 mM potassium phosphate:acetonitrile = 100:0 for 5 mins, a linear gradient to 92:8 for a following 1 min, 80:20 for 7 mins, 20:80 for 1 min, 100:0 for 1 min, and 100:0 for a additional 8 min; flow rate, 0.8 mL/min.

#### 1-2-4. アミノ酸要求性評価結果 - *L. gasseri*, *L. brevis*- グリシン

*L. gasseri* 及び *L. brevis* において、*glyA* オルソログが存在 (*LGAS0256* 及び *LVIS1287*) するのにも関わらずグリシンの要求性を示した。両オルソログの *glyA* との相同性は高く (Table 1-7)、*glyA* オルソログが機能していると予想される (グリシン要求性を示さなかった) *L. fermentum*、*L. reuteri* のオルソログと比較しても目立った 1 次配列上の違いはなかった (Fig. 1-11)。*L. gasseri*、*L. brevis* においては、スレオニンからグリシンへの経路 (*tdh*、*kbl*、*ltaE*) のオルソログも存在しない (Table 1-10, Fig. 1-7)。ピルビン酸の添加 (終濃度 1 g/L~20 g/L)、セリン、スレオニン、システインの追加添加 (各アミノ酸の増量を個別に実施、終濃度 0.8 g/L) 硫酸アンモニウムを追加添加 (終濃度 10 g/L) を行ったが生育は認められず、グリシン要求性の理由を掴むことはできなかった。一方で、*E. coli* においては *glyA* mRNA の 3'末端の構造が自身の分解に関わっている (Plamann *et al.*, 1990) とされ、*L. gasseri* 及び *L. brevis* においても同様の機構が存在し、今回要求性評価を行った培養条件で mRNA の分解を受けやすかったのかもしれない。いずれにせよ、より詳細に検証するためには、転写物の解析や精製酵素による *in vitro* での反応検討が必要になると考えられる。

#### アスパラギン・アスパラギン酸

Table 1-10 に示したように、*L. gasseri* 及び *L. brevis* においては、aspartate aminotransferase、asparaginase、asparagine synthetase のオルソログが存在するため、アスパラギン酸やアスパラギンを個々に除いても生育が認められたが、両方を除いた場合は生育が認められなかった (data not shown)。フマル酸からの供給経路である aspartate ammonia-lyase のオルソログは存在しないが、aspartate aminotransferase のオルソログが存在するため、オキサロ酢酸からアスパラギン酸が供給されるはずであり、更には asparagine synthetase オルソログによりアスパラギンも供給可能であるため、データベースから考えるとアスパラギン酸とアスパラギンを共に含まない培地でも生育は認められるはずである。生育評価にあたり、グルタミン酸の増量 (終濃度 0.8 g/L) やオキサロ酢酸の添加 (終濃度 0.4 g/L) を行ったが、同様に生育は認められなかった。このことから、aspartate aminotransferase とアノテーションされている *LGAS1128* 及び *LVIS0855* の産物は、オキサロ酢酸を基質にできない可能性が考えられる。両者は glutamate-pyruvate aminotransferase (L-Ala 生合成) や phenylalanine/tyrosine aminotransferase としても機能が予測されており、実際にはオキサロ酢酸へアミノ基を転移することはできない (或いは非常に活性が低い) のかもしれない。詳細を明らかにするには、酵素を精製し、オキサロ酢酸等の幾つかの基質と反応させるといった *in vitro* の検証が必要と考えられる。



**Fig. 1-11 Alignment of GlyA in *E. coli* and its orthologs in *Lactobacilli***

ClustalX 1.83 program was used to perform alignment of 5 protein sequences. The position of asterisks showed amino acids, which the ortholog of *L. fermentum*, *L. reuteri* and GlyA in *E. coli* has in common, but the ortholog of *L. gasseri* and *L. brevis* has another.

### 1-2-5. 核酸系物質の要求性評価結果 -全貌-

続いて各菌株の核酸系物質の要求性について、核酸塩基やヌクレオシド、ヌクレオチド等を用いて評価を行った。アミノ酸の Single-omission 評価の際と同様に、MRS 培地で前培養（37℃或いは 30℃で 1~2 日間液体培養）を行い、集菌・洗浄後、LSP 培地に植菌して 1~3 日間培養した。一般に、核酸系物質の生合成については *de novo* 経路と *salvage* 経路が存在するため、全体としては複雑な代謝経路が示される。評価に用いた *Lactobacillus* 4 菌株に関しては、Table 1-4 に示した 8 つの核酸・塩基類を加えることで十分な生育を示したが、要求性評価にあたっては、まず Adenine、Guanine、Uridine、Cytidine、Thymidine の 5 つを添加した培地をベースとし、それらを 1 つずつ取り除くことから生育評価を始めた。続いて、必要に応じて Adenosine、AMP、ADP、ATP、Guanosine、deoxyguanosine、GMP、GDP、GTP、Inosine、deoxyinosine、IMP、XMP、hypoxanthine、Xanthine、Xanthosine、orotate、Uracil、UMP、UDP、UTP、cytosine、CMP、CDP、CTP、deoxyuridine、dUMP、dTMP を終濃度が 50~300 mg/L となるように添加し、生育評価を行った。

核酸系物質の生合成経路 (Fig. 1-12~1-14) のそれぞれの Step のオルソログの有無については Table 1-14~1-16 に示した通りであり、それらの情報と栄養要求性評価の結果を Table 1-17 にまとめた。オルソログに関しては、アミノ酸の際と同様に、KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) の pathway 情報、及び KEGG サイト、DDBJ の GIB サイト (閉鎖中) が提供する Blast 検索 (BLASTP) を参考に精査した。BLASTP における検索元配列には *E. coli* K-12 MG1655 株の Protein Sequence を用い、それらに対する各オルソログの E-value を Table 1-14~1-16 に示した。

**Table 1-14 Orthologs for IMP biosynthesis from D-Ribose-1P in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
phosphopentomutase	<i>deoB</i>	ND	ND	LA R0106 (5e-82)	ND	LVIS1594 (5e-81)
phosphopentomutase	<i>pgm</i>	LAF0350 (2e-19)	LAF0350 (2e-19)	LA R0369 (6e-22)	LGAS1319 (2e-15)	LVIS1907 (1e-18)
ADP-ribose pyrophosphatase	<i>nudE</i>	ND	ND	ND	ND	ND
adenosine nucleotide hydrolase	<i>nudF</i>	LAF0584 (※1)	LAF0584 (※1)	LA R0580 (※1)	LGAS1194 (※1)	LVIS1439 (※1)
phosphoribosylpyrophosphate synthase	<i>prs</i>	LAF0196 (2e-91)	LAF0196 (2e-91)	LA R0212 (6e-93)	LGAS0212 (7e-90)	LVIS0476 (2e-91)
amidophosphoribosyltransferase	<i>purF</i>	LAF0128 (7e-86)	LAF0128 (7e-86)	LA R0135 (4e-84)	ND	ND
phosphoribosylglycinamide synthetase phosphoribosylamine-glycine ligase	<i>purD</i>	LAF0132 (1e-86)	LAF0132 (1e-86)	LA R0139 (2e-82)	ND	ND
phosphoribosylglycinamide formyltransferase	<i>purN</i>	LAF0130 (3e-30)	LAF0130 (3e-30)	LA R0137 (3e-35)	ND	ND
	<i>purT</i>	ND	ND	ND	ND	ND
phosphoribosylformyl-glycineamide synthetase	<i>purL</i> (※2)	LAF0127 (2e-30)	LAF0127 (2e-30)	LA R0134 (5e-25)	ND	ND
		LAF0126 (4e-15)	LAF0126 (4e-15)	LA R0133 (8e-14)	ND	ND
		LAF0125 (※1)	LAF0125 (※1)	LA R0132 (※1)	ND	ND
phosphoribosylaminoimidazole synthetase	<i>purM</i>	LAF0129 (5e-79)	LAF0129 (5e-79)	LA R0136 (9e-82)	ND	ND
<i>N</i> <sup>5</sup> -carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase	<i>purK</i>	LAF0119 (2e-40)	LAF0119 (2e-40)	LA R0129 (3e-40)	ND	LVIS1635 (4e-11)
		LAF0447 (8e-09)	LAF0447 (8e-09)	LA R1357 (1e-07)	ND	ND
<i>N</i> <sup>5</sup> -carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	<i>purE</i>	LAF0118 (9e-33)	LAF0118 (9e-33)	LA R0128 (2e-36)	ND	ND
phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthetase	<i>purC</i>	LAF0124 (5e-42)	LAF0124 (5e-42)	LA R0131 (7e-47)	ND	ND
adenylosuccinate lyase	<i>purB</i>	LAF0120 (2e-18)	LAF0120 (2e-18)	LA R0130 (2e-20)	LGAS0391 (7e-23)	LVIS0228 (7e-22)
AICAR (※3) transformylase	<i>purH</i>	LAF0131 (e-133)	LAF0131 (e-133)	LA R0138 (e-140)	ND	ND

ND : not determined

※1 No hits in blast search but annotated genes are exist in genome database.

※2 In *E. coli*, phosphoribosylformylglycinamide synthase is composed of a single polypeptide chain, while in *Lactobacilli* three subunits (the orthologs of *purL*, *purQ*, *purS*) are presumed to be required for those function.

※3 Abbreviation: AICAR, 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxamide.



**Table 1-15 Orthologs for purine metabolism in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E.coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
adenylosuccinate synthetase	<i>purA</i>		LAF0044 (e-115)	LA R0066 (e-104)	LGAS0390 (4e-99)	LVIS0227 (e-134)
adenylosuccinate lyase	<i>purB</i>		LAF0120 (2e-18)	LA R0130 (2e-20)	LGAS0391 (7e-23)	LVIS0228 (7e-22)
adenylate kinase	<i>adk</i>		LAF1494 (2e-44)	LA R1373 (3e-45)	LGAS0311 (1e-36)	LVIS1669 (2e-44)
nucleoside diphosphate kinase	<i>ndk</i>		LAF1008 (1e-23)	LA R0192 (2e-25)	ND	LVIS1367 (3e-22)
pyruvate kinase	<i>pykF</i>		LAF0868 (e-113)	LA R0722 (e-116)	LGAS0882 (e-120)	LVIS0765 (e-115)
	<i>pykA</i>		LAF0868 (3e-78)	LA R0722 (4e-74)	LGAS0882 (5e-80)	LVIS0765 (2e-73)
ribonucleoside diphosphate reductase 1, $\alpha$ subunit	<i>nrdA</i>		LAF1674 (1e-39)	LA R0312 (4e-40)	ND	LVIS0596 (6e-38)
			LAF0280 (2e-38)			
ribonucleoside diphosphate reductase 1, $\beta$ subunit	<i>nrdB</i>		LAF0279 (3e-10)	LA R0311 (1e-09)	ND	LVIS0595 (5e-10)
			LAF1672 (1e-05)			
			LAF1673 (0.12)			
ribonucleoside-diphosphate reductase 2, $\alpha$ subunit	<i>nrdE</i>		LAF1674 (0.0)	LA R0312 (0.0)	ND	LVIS0596 (0.0)
			LAF0280 (0.0)			
ribonucleoside diphosphate reductase 2, $\beta$ subunit	<i>nrdF</i>		LAF0279 (1e-88)	LA R0311 (2e-85)	LGAS1705 (2e-43)	LVIS0595 (2e-87)
			LAF1672 (3e-70)			
			LAF1673 (4e-31)			
ribonucleoside-triphosphate reductase	<i>nrdD</i>		LAF1376 (0.0)	LA R1249 (0.0)	LGAS0138 (0.0)	ND
5'-ribonucleotidase	<i>ushA</i>		ND	ND	LGAS0878 (1e-15)	LVIS2142 (1e-15)
					LGAS0442 (2e-15)	LVIS0040 (1e-14)
					LGAS1067 (1e-10)	LVIS1186 (4e-10)
deoxyribonucleoside 5'-monophosphate phosphatase	<i>yfbR</i>		LAF0351 (7e-13)	LA R0370 (7e-12)	LGAS0083 (4e-09)	LVIS0646 (8e-10)
5'(3')-nucleotidase and polyphosphatase	<i>surE</i>		ND	ND	ND	ND
pyrimidine nucleotidase	<i>yjgG</i>		ND	ND	LGAS0027 (2e-24)	LVIS2306 (3e-19)
						LVIS1351 (9e-11)
inosine-guanosine kinase	<i>gsk</i>		ND	ND	ND	ND
adenosine deaminase	<i>add</i>		ND	ND	LGAS1406 (3e-36)	LVIS0278 (1e-35)
purine nucleoside phosphorylase	<i>deoD</i>		ND	LA R0108 (3e-69)	LGAS1192 (2e-04)	LVIS1593 (3e-61)
ribonucleoside hydrolase	<i>rihA</i>		LAF0165 (e-103)	LA R0823 (e-103)	LGAS0558 (6e-46)	LVIS2188 (3e-68)
				LA R0096 (3e-53)		LVIS2069 (5e-56)
			LAF1704 (7e-42)	LA R1547 (4e-46)	LGAS0870 (3e-09)	LVIS1816 (7e-43)
						LVIS0403 (5e-09)
			LAF0165 (1e-60)	LA R0823 (4e-60)	LGAS0558 (3e-38)	LVIS2188 (e-129)
	<i>rihB</i>		LA R0096 (4e-51)		LVIS2069 (4e-52)	
		LAF1704 (9e-38)	LA R1547 (3e-44)	LGAS0870 (2e-12)	LVIS1816 (4e-42)	
					LVIS0403 (3e-12)	
AMP nucleosidase	<i>amn</i>		ND	ND	ND	ND
adenine phosphoribosyltransferase	<i>apt</i>		LAF0630 (4e-63)	LA R1358 (5e-07)	LGAS0827 (6e-47)	LVIS1376 (3e-44)
			LAF1478 (8e-09)			
cryptic adenine deaminase	<i>ade</i>		ND	ND	ND	ND
hypoxanthine phosphoribosyltransferase	<i>hpt</i>		LAF0220 (1e-40)	LA R0256 (9e-35)	LGAS0566 (1e-36)	LVIS0522 (1e-42)
xanthine-guanine phosphoribosyltransferase	<i>gpt</i>		LAF1478 (※1)	ND	ND	ND
xanthine dehydrogenase subunit	<i>xdhA</i>		ND	ND	ND	ND
			<i>xdhB</i>	ND	ND	ND
			<i>xdhC</i>	ND	ND	ND
aldehyde oxidoreductase/xanthine dehydrogenase subunit	<i>paoA</i>		ND	ND	ND	ND
			<i>paoB</i>	ND	ND	ND
			<i>paoC</i>	ND	ND	ND
IMP dehydrogenase	<i>guaB</i>		LAF0081 (5e-66)	LA R0110 (4e-88)	LGAS0041 (2e-64)	LVIS2058 (3e-68)
GMP synthetase	<i>guaA</i>		ND	LA R1510 (e-164)	LGAS0231 (e-161)	LVIS1759 (e-161)
GMP reductase	<i>guaC</i>		LAF0081 (6e-51)	LA R0110 (2e-49)	LGAS0041 (4e-49)	LVIS2058 (5e-50)
				LA R0065 (8e-44)	LGAS0389 (1e-40)	LVIS0226 (2e-42)
xanthosine phosphorylase	<i>xapA</i>		ND	ND	ND	ND
guanine deaminase	<i>guaD</i>		LAF1014 (7e-46)	ND	ND	LVIS1043 (3e-47)
guanylate kinase	<i>gmk</i>		LAF1255 (2e-46)	LA R1109 (1e-44)	LGAS0758 (5e-44)	ND
			LAF1666 (3e-12)	LA R1529 (1e-09)	LGAS1700 (4e-13)	
dTTP/XTP pyrophosphatase	<i>rdgB</i>		LAF0532 (6e-39)	LA R0528 (2e-43)		
			LAF1337 (6e-12)	LA R1209 (4e-10)	LGAS0430 (8e-42)	LVIS1213 (8e-41)
deoxyguanosine triphosphate triphosphohydrolase	<i>dgt</i>		ND	ND	ND	ND

ND: not determined

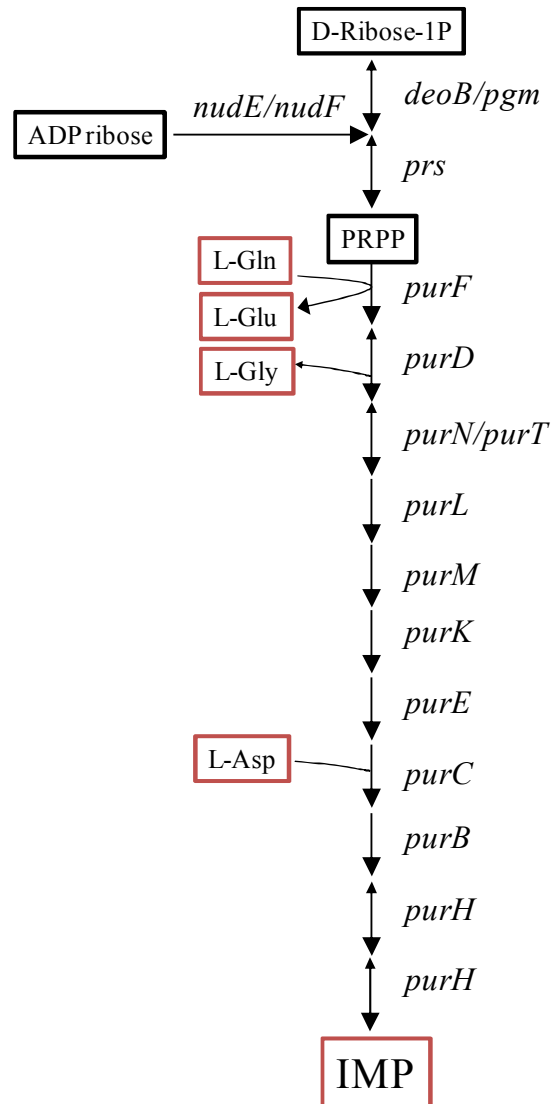
※1 No hits in blast search but annotated genes are exist in genome database.

**Table 1-16 Orthologs for pyrimidine metabolism in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E.coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
carbamoyl phosphate synthetase, subunit	<i>carA</i>		<i>LAF1203</i> (6e-82) <i>LAF0727</i> (7e-64) <i>LAF1162</i> (2e-64)	<i>LA R0081</i> (2e-64) <i>LA R0876</i> (7e-39)	<i>LGAS1088</i> (9e-79) <i>LGAS1013</i> (1e-37)	<i>LVIS0830</i> (5e-64)
	<i>carB</i>		<i>LAF1202</i> (0.0) <i>LAF0728</i> (0.0) <i>LAF1161</i> (1e-78)	<i>LA R0080</i> (0.0) <i>LA R0877</i> (7e-82)	<i>LGAS1087</i> (0.0) <i>LGAS01012</i> (e-118)	<i>LVIS0829</i> (e-104)
aspartate carbamoyltransferase, subunit	<i>pyrB</i>		<i>LAF1205</i> (1e-33)	<i>LA R0117</i> (2e-33)	<i>LGAS1090</i> (5e-31)	ND
	<i>pyrI</i>		ND	ND	ND	ND
dihydroorotase	<i>pyrC</i>		<i>LAF1204</i> (0.073)	<i>LA R0118</i> (※1)	<i>LGAS1089</i> (0.13)	ND
dihydroorotate dehydrogenase	<i>pyrD</i>		<i>LAF1201</i> (4e-12)	<i>LA R0119</i> (6e-12) <i>LA R1241</i> (3e-05)	<i>LGAS1092</i> (2e-10)	ND
orotate phosphoribosyltransferase	<i>pyrE</i>		<i>LAF0048</i> (2e-10)	<i>LA R0121</i> (1e-08)	<i>LGAS1094</i> (6e-08)	<i>LVIS0228</i> (3e-06)
orotidine-5'-phosphate decarboxylase	<i>pyrF</i>		<i>LAF0047</i> (7e-38)	<i>LA R0120</i> (2e-38)	<i>LGAS1093</i> (1e-42)	<i>LVIS0229</i> (1e-34)
UMP kinase	<i>pyrH</i>		<i>LAF0716</i> (2e-52)	<i>LA R0659</i> (1e-50)	<i>LGAS0803</i> (9e-63)	<i>LVIS1348</i> (1e-52)
cytidylate kinase	<i>cmk</i>		<i>LAF0879</i> (1e-44)	<i>LA R0732</i> (1e-36)	<i>LGAS0891</i> (5e-44) <i>LGAS0878</i> (1e-15) <i>LGAS0442</i> (2e-15) <i>LGAS1067</i> (1e-10)	<i>LVIS0776</i> (3e-41) <i>LVIS2142</i> (1e-15) <i>LVIS0040</i> (1e-14) <i>LVIS1186</i> (4e-10)
5'-ribonucleotidase	<i>ushA</i>		ND	ND		
deoxyribonucleoside 5'-monophosphate phosphatase	<i>yfbR</i>		<i>LAF0351</i> (7e-13)	<i>LA R0370</i> (7e-12)	<i>LGAS0083</i> (4e-09)	<i>LVIS0646</i> (8e-10)
5'(3)-nucleotidase and polyphosphatase	<i>surE</i>		ND	ND	ND	ND
pyrimidine nucleotidase	<i>yjgG</i>		ND	ND	<i>LGAS0027</i> (2e-24)	<i>LVIS2306</i> (3e-19) <i>LVIS1351</i> (9e-11)
uridine kinase	<i>udk</i>		<i>LAF1287</i> (9e-55)	<i>LA R1148</i> (2e-54)	<i>LGAS0537</i> (9e-51)	<i>LVIS1007</i> (1e-47)
thymidine phosphorylase / uracil phosphorylase	<i>deoA</i>		ND	<i>LA R0107</i> (2e-96)	ND	<i>LVIS1591</i> (3e-94)
purine nucleoside phosphorylase	<i>deoD</i>		ND	<i>LA R0108</i> (3e-69)	<i>LGAS1192</i> (2e-04)	<i>LVIS1593</i> (3e-61)
uridine phosphorylase	<i>udp</i>		ND	<i>LA R0108</i> (5e-20)	<i>LGAS1043</i> (0.002)	<i>LVIS1593</i> (6e-16) <i>LVIS1437</i> (7e-06)
cytidine deaminase	<i>cdd</i>		ND	ND	ND	<i>LVIS0283</i> (3e-08)
uracil phosphoribosyltransferase	<i>upp</i>		<i>LAF0431</i> (2e-60)	<i>LA R0446</i> (8e-61)	<i>LGAS1245</i> (1e-60)	<i>LVIS1286</i> (1e-64)
	<i>preT</i>		ND	<i>LA R1242</i> (e-124)	ND	ND
dihydropyrimidine dehydrogenase subunit	<i>preA</i>		<i>LAF1201</i> (2e-26)	<i>LA R1241</i> (e-166) <i>LA R0119</i> (7e-30)	<i>LGAS1092</i> (8e-33)	ND
cytosine deaminase	<i>codA</i>		<i>LAF0912</i> (e-133)	<i>LA R0248</i> (e-135)	ND	<i>LVIS1932</i> (e-135)
	<i>rihA</i>		<i>LAF0165</i> (e-103) <i>LAF1704</i> (7e-42)	<i>LA R0823</i> (e-103) <i>LA R0096</i> (3e-53) <i>LA R1547</i> (4e-46)	<i>LGAS0558</i> (6e-46) <i>LGAS0870</i> (3e-09)	<i>LVIS2188</i> (3e-68) <i>LVIS2069</i> (5e-56) <i>LVIS1816</i> (7e-43) <i>LVIS0403</i> (5e-09)
ribonucleoside hydrolase	<i>rihB</i>		<i>LAF0165</i> (1e-60) <i>LAF1704</i> (9e-38)	<i>LA R0823</i> (4e-60) <i>LA R0096</i> (4e-51) <i>LA R1547</i> (3e-44)	<i>LGAS0558</i> (3e-38) <i>LGAS0870</i> (2e-12)	<i>LVIS2188</i> (e-129) <i>LVIS2069</i> (4e-52) <i>LVIS1816</i> (4e-42) <i>LVIS0403</i> (3e-12)
nucleoside diphosphate kinase	<i>ndk</i>		<i>LAF1008</i> (1e-23)	<i>LA R0192</i> (2e-25)	ND	<i>LVIS1367</i> (3e-22)
CTP synthase	<i>pyrG</i>		<i>LAF0202</i> (e-157)	<i>LA R0564</i> (e-162)	<i>LGAS0226</i> (e-148)	<i>LVIS0487</i> (e-166)
nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase	<i>mazG</i>		ND	ND	ND	ND
cytidylate kinase	<i>cmk</i>		<i>LAF0879</i> (1e-44)	<i>LA R0732</i> (1e-36)	<i>LGAS0891</i> (5e-44)	<i>LVIS0776</i> (3e-41)
ribonucleoside diphosphate reductase 1, $\alpha$ subunit	<i>nrdA</i>		<i>LAF1674</i> (1e-39) <i>LAF0280</i> (2e-38)	<i>LA R0312</i> (4e-40)	ND	<i>LVIS0596</i> (6e-38)
ribonucleoside diphosphate reductase 1, $\beta$ subunit	<i>nrdB</i>		<i>LAF0279</i> (3e-10) <i>LAF1672</i> (1e-05) <i>LAF1673</i> (0.12)	<i>LA R0311</i> (1e-09)	ND	<i>LVIS0595</i> (5e-10)
ribonucleoside-diphosphate reductase 2, $\alpha$ subunit	<i>nrdE</i>		<i>LAF1674</i> (0.0) <i>LAF0280</i> (0.0)	<i>LA R0312</i> (0.0)	<i>LGAS1503</i> (※1)	<i>LVIS0596</i> (0.0)
ribonucleoside diphosphate reductase 2, $\beta$ subunit	<i>nrdF</i>		<i>LAF0279</i> (1e-88) <i>LAF1672</i> (3e-70) <i>LAF1673</i> (4e-31)	<i>LA R0311</i> (2e-85)	<i>LGAS1705</i> (2e-43)	<i>LVIS0595</i> (2e-87)
ribonucleoside-triphosphate reductase	<i>nrdD</i>		<i>LAF1376</i> (0.0)	<i>LA R1249</i> (0.0)	<i>LGAS0138</i> (0.0)	ND
dTMP kinase	<i>tmk</i>		<i>LAF0287</i> (2e-27)	<i>LA R0319</i> (7e-32)	<i>LGAS0372</i> (3e-30)	<i>LVIS0604</i> (4e-29)
deoxyuridine triphosphatase	<i>dut</i>		<i>LAF0256</i> (3e-10)	<i>LA R0288</i> (2e-08)	<i>LGAS0335</i> (3e-10)	<i>LVIS0576</i> (4e-10)
dITP/XTP pyrophosphatase	<i>rdgB</i>		<i>LAF0532</i> (6e-39) <i>LAF1337</i> (6e-12)	<i>LA R0528</i> (2e-43) <i>LA R1209</i> (4e-10)	<i>LGAS0430</i> (8e-42)	<i>LVIS1213</i> (8e-41)
thymidine kinase / deoxyuridine kinase	<i>tdk</i>		<i>LAF0426</i> (8e-48)	<i>LA R0441</i> (6e-52)	<i>LGAS1249</i> (2e-47)	<i>LVIS1291</i> (8e-50)
thymidylate synthase	<i>thyA</i>		<i>LAF0887</i> (6e-86)	<i>LA R0739</i> (4e-85)	<i>LGAS0830</i> (8e-76)	<i>LVIS0784</i> (3e-86)

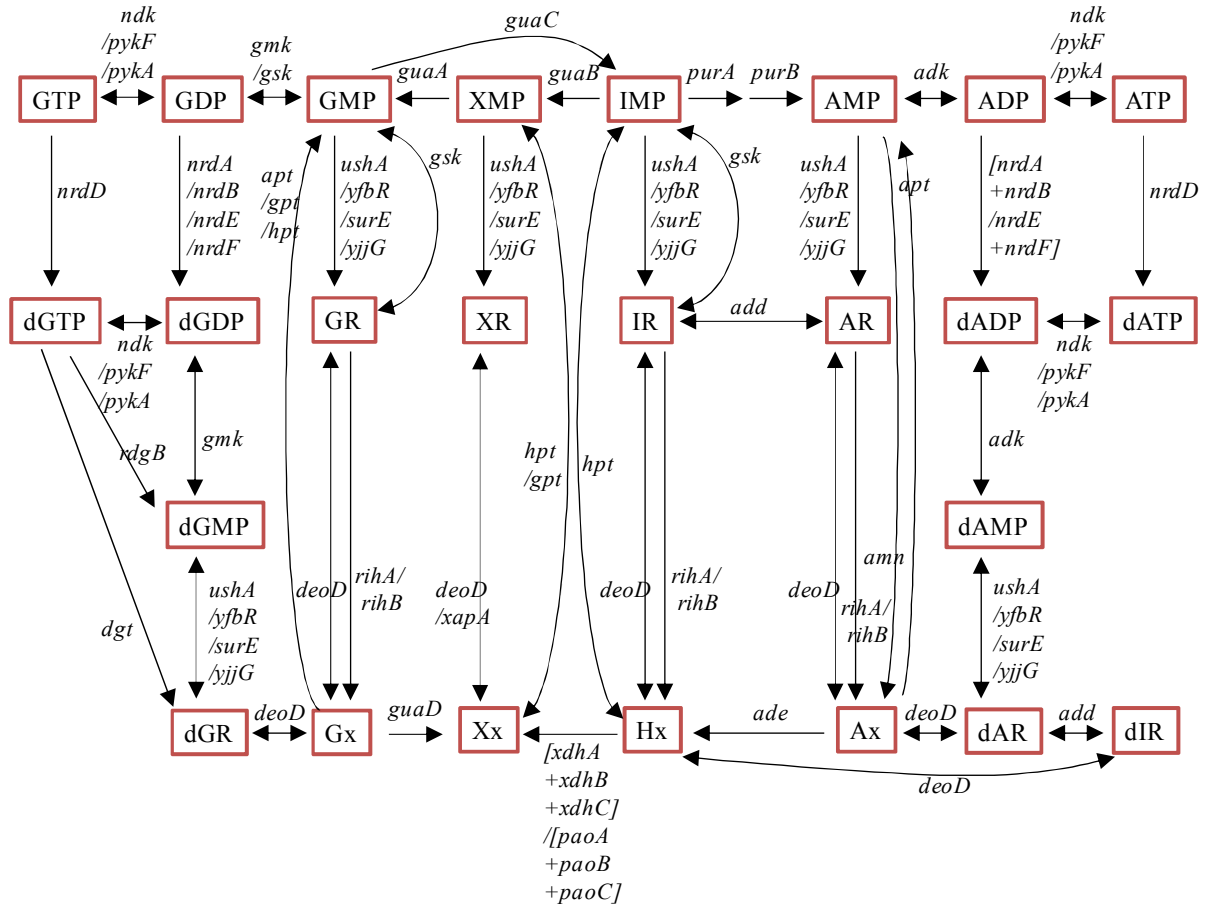
ND: not determined

※1 No hits in blast search but annotated genes are exist in genome database.



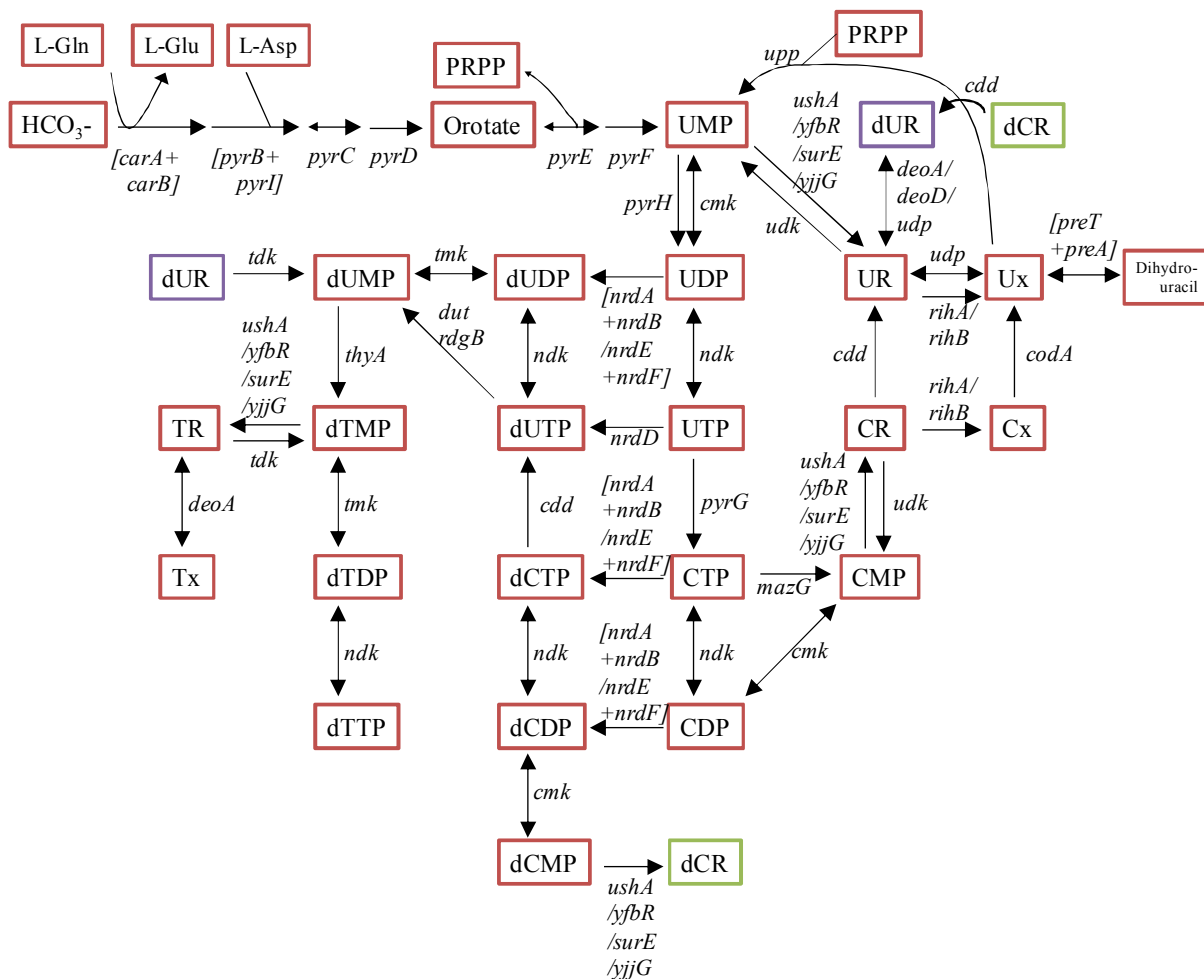
**Fig. 1-12 The biosynthetic pathway for IMP from D-Ribose-1P in *E. coli***

Abbreviation : PRPP, 5-phospho- $\alpha$ -D-ribose 1-diphosphate.



**Fig. 1-13 The Purine metabolism from IMP in *E. coli***

Abbreviation : AR, adenosine; dAR, deoxyadenosine; Ax, adenine; GR, guanosine; dGR, deoxyguanosine; Gx, guanine; IR, inosine; dIR, deoxyinosine; Hx, hypoxanthine; XR, xanthosine; Xx, Xanthine .



**Fig. 1-14 The Pyrimidine metabolism in *E. coli***

Abbreviation : PRPP, 5-phospho- $\alpha$ -D-ribose 1-diphosphate; UR, uridine; dUR, deoxyuridine; Ux, uracil; CR, cytidine; dCR, deoxycytidine; Cx, cytosine; TR, thymidine; Tx, thymine.

**Table 1-17 The summary of the assay of purine or pyrimidine auxotrophy and the information of genome database in 4 *Lactobacilli***

	<i>L. fermentum</i>		<i>L. reuteri</i>		<i>L. gasseri</i>		<i>L. brevis</i>	
	growth test	database (※5)	growth test (※4)	database	growth test (※4)	database (※5)	growth test (※4)	database (※5)
Purine	V	<b>impossible</b> ( <i>guaA</i> ortholog)	N (IMP)	<b>possible</b>	N (IMP)	impossible (PRPP~IMP)	N (IMP)	impossible (PRPP ~IMP)
Pyrimidine	V	possible	V	possible	N (TR, dUR, dCR, dUMP)	<b>impossible</b> ( <i>ndk</i> ortholog)	N (Orotate)	impossible (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ~Orotate)

※1 The results of growth tests were represented by the following abbreviation: V, viable; N, nonviable.

※2 The case that genes required for purine or pyrimidine *de novo* biosynthesis are exist in genome database is represented by "possible", while the case that more than one gene are missig is represented by "impossible".

※3 Bold type represent the discrepancy between the results of growth test and the information in genome database.

※4 The purine or pyrimidine for normal growth in the growth tests.

※5 The pathway or ortholog missing in genome database.

結論としては、要求性評価結果とゲノムデータベースの結果はほぼすり合う形となったが、*L. fermentum* におけるプリン代謝において、新規経路（或いは既存酵素の新規機能）の可能性が伺える結果が存在した。以下に、菌株ごとの結果を記す。

#### 1-2-6. 核酸系物質の要求性評価結果 -*L. fermentum*, *L. reuteri*-

*L. fermentum* については Table 1-17 に示すように核酸系物質の生合成 (*de novo*) に必要な遺伝子を大凡揃えていることがゲノムデータベースの精査により明らかとなったが、プリン代謝経路 (*de novo*) において、XMP より GMP を生成する GMP synthetase をコードする *guaA* のオルソログが存在しないにも関わらず核酸系物質の要求性を示さなかった。Table 1-15 及び Fig. 1-13 に示したように、XMP 或いは GMP より Xanthosine 或いは Guanosine を生成する活性を持つ *yfbR* のオルソログ *LAF0351*、Guanosine より Guanine を生成する活性を持つ *rihA/rihB* のオルソログ *LAF0165/LAF1704*、Guanine 或いは Xanthine より GMP 或いは XMP を生成するまたはその逆反応を担う活性を持つ *gpt/hpt/apt* のオルソログ *LAF1478/LAF0630/LAF1478/LAF0926/LAF0220* は存在するが、Xanthosine から Guanosine、或いは Xhathine から Guanine を生成するような酵素は存在しないため、GMP は生合成できないと考えられる。GMP より IMP を生成する *guaC* のオルソログも存在しないため、その逆反応の可能性も期待できない。Guanine より Xanthine を生成する deaminase である *guaD* のオルソログは存在するが、逆反応は考えにくい。従って、核酸系物質を加えない合成培地での生育の際は、GMP が何らかの新規経路、或いは既知酵素の新規機能で産生されることで生育が可能となっているはずである。

本研究においては更なる解析には踏み込まなかったが、新しい発見の発端として期待できる結果だと考えられる。*E. coli* において *guaA* 欠損株は最少培地で生育できないため、*guaA* 欠損株に *L. fermentum* のゲノムライブラリーを導入することで、上記現象の謎を解く鍵遺伝子を見つけることができるかもしれない。

また *L. reuteri* について、ピリミジン系物質に関しては、ゲノムデータベースの情報通り要

求性は認められなかったのに対し、プリン生合成に関しては、データベース上に生合成に必要な遺伝子セットが存在するのにも関わらず、Guanine 非添加の際は生育が認められなかった。その他のプリン系物質の要求性評価を行った結果、IMP、Inosine、Hypoxanthine、XMP、xanthosine、xanthine、GMP、Guanosine を個別に添加した際は生育し、Adenine や Adenosine 添加では生育が認められなかった。Adenine、Adenosine で非生育であったのは、*ade* オルソログ及び *add* オルソログがデータベース上に存在しないことと一致する。IMP 添加で生育が認められたこと、解糖系及びペントースリン酸経路を経て PRPP を生合成する遺伝子群はデータベース上に存在すること (data not shown) から、PRPP~IMP までの一連の遺伝子のいずれかが Pseudogene である可能性が考えられた。

### 1-2-7. 核酸系物質の要求性評価結果 -*L. gasseri*, *L. brevis*-

*L. gasseri* におけるプリン系物質の要求性評価の結果、Adenine 或いは Guanine の要求性が認められた。Adenine、Guanine から AMP や GMP を経て IMP を供給する経路がゲノムデータベース上には存在し、またそれらの非存在下でも、IMP を添加すると生育が認められた。Table 1-14 に示したように、IMP に至る経路のオルソログは *L. gasseri* には殆ど存在しない。また、Table 1-15 に示したようにプリン系物質の salvage 経路に関するオルソログはほぼ全て存在しており、実際に Inosine、Hypoxanthine、XMP、Xanthosine、Xanthine、GMP、Guanosine を個別に添加した際も生育が認められた。これらの結果より、要求性評価とゲノムデータベースの矛盾点は存在しないと考えられた。

一方 *L. gasseri* のピリミジン系物質について、最初に行った Uridine、Cytidine、Thymidine 要求性評価の結果、Thymidine 要求性を示すことがわかった。続いて、その他のピリミジン系物質を添加して生育評価を行った結果、deoxyuridine、deoxycytidine、dTMP、dUMP の添加の際は生育が認められ、Uridine、Uracil、UMP、UDP、UTP、CMP、CDP、CTP、オロチン酸の添加では生育は認められなかった。

*L. gasseri* のゲノム情報の重要な特徴として、nucleoside diphosphate kinase をコードする *ndk* オルソログが存在しない点が挙げられる。プリン代謝においては、*ndk* オルソログが存在しなくても、*pykF* 或いは *pykA* のオルソログである *LAGS0882* が ADP から ATP の生成や GDP から GTP の生成を担うと考えられるが、ピリミジン代謝においては代用できる酵素は存在しないため、UDP kinase、CDP kinase、dTDP kinase 反応は行われなことが予想される。しかしながら、*E. coli* の *ndk* 破壊株が最少培地でも生育するという報告 (Joyce *et al.*, 2006; Baba *et al.*, 2006; Feist *et al.*, 2007) があることを考えると、UTP、CTP、dTTP は *ndk* とは異なる他の kinase によっても産生される可能性が考えられる。従って、*L. gasseri* はピリミジン系核酸の triphosphate についても *de novo* 合成が可能であることが推察される。

上述のように、dTMP の添加で生育が認められ、dUMP の添加においても *thyA* のオルソログである *LGAS0830* が存在することから dTMP が供給され生育すると予想される。deoxyuridine 或いは thymidine の添加時は、*tdk* のオルソログである *LGAS1249* により同様に dTMP が供給

されると予想される。deoxycytidine 添加の際に生育した理由については、*L. gasseri* には deoxycytidine を deoxyuridine へ変換する活性を持つ *cdd* のオルソログは存在しないが、*E. coli* の有していない deoxycytidylate deaminase をコードする *LGAS0202* を持つ。この酵素は dCMP より dUMP を生成するとされており、同時に deoxycytidine を基質に deoxyuridine を生成する可能性が考えられる。また、cytosine を uracil へ変換する *codA* のオルソログ *LGAS0367* が存在するため、もしかするとこの酵素が deoxycytidine を deoxyuridine へと変換する活性を有しているのかもしれない。

これらの結果より、dUMP が供給されれば生育が可能となると結論付けることができるため、thymidine 等の要求性を示した理由として、dUMP 以前の反応（dUDP 或いは dUTP を経て dTMP に至る経路）が滞っている可能性が考えられた。*tmk* のオルソログ *LGAS372* に関しては、dTMP から dTDP の反応を担っている（dTMP が供給されれば生育可能であった）ことを考えれば Pseudogene である可能性は低く、また *dut* 及び *rdgB* のオルソログである *LGAS0335* 及び *LGAS0372* も存在するため、更に上流に原因があると考えられた。しかし、UDP からの dUDP の生成、及び UTP からの dUTP の生成を担う遺伝子のオルソログが存在し、UTP から CTP を生成する *pyrG* のオルソログも存在し、更にはそれ以前の *de novo* 合成に関与するオルソログもほぼ全て存在した。但し、生育評価の結果より、UDP や UTP 等を添加しても生育が認められなかったことを考えると、ribonucleoside-diphosphate reductase や ribonucleoside-triphosphate reductase が働いていないと考えることもできるため、*nrdD* オルソログである *LGAS0138* 或いは *nrdE* 及び *nrdF* オルソログである *LGAS1503* 及び *LGAS1705* が Pseudogene、または他の機能を持つ酵素をコードする遺伝子である可能性も考えられた。

以上のように、*L. gasseri* のピリミジン系物質の代謝に関しては、全体として曖昧な結果となり、新規経路の可能性を見出すことはできなかった。今後、*in vitro* において各オルソログの機能を検証する実験や、遺伝子組換え系を整備した上で各オルソログの破壊株を用いて生育評価を行うなどの検証が必要になると考えられる。

また、*L. brevis* に関しては、プリン系については Adenine 或いは Guanine 要求性、ピリミジン系については Uridine 或いは Cytidine 要求性を示した。ゲノムデータベースでは中間体である IMP、或いはオロチン酸までの生合成遺伝子を欠いていたため、それらを添加した結果、生育が認められた。従って、要求性の結果とゲノム情報とに目立った差異は見出せないと考えられ、それ以上の検証は行わなかった。

#### 1-2-8. ビタミン要求性評価結果 -全貌-

続いて各菌株のビタミン要求性について評価を行った。アミノ酸や核酸・塩基類の評価の際と同様に、MRS 培地で前培養を行い、集菌・洗浄後、LSP 培地に植菌して 1~3 日間培養した。なお、いずれの菌株においても、Table 1-4 に示すビタミンの中で Cobalamin、Inositol、Ascorbic acid、Biotin、Lipoic acid については、それらを全て除いた場合でも生育に差は認められなかったため評価の対象から除いた。それら以外のビタミンについて、培地より 1 種ず



つ除くことで要求性を調査した。

Thiamin (Vitamin B1)、Niacin (Vitamin B3)、Pantothenate (Vitamin B5) 及び CoA、Vitamin B6、Riboflavin (Vitamin B2)、Folic acid (Vitamin B9) 及び *p*-Aminobenzoate の生合成経路 (Fig. 1-15~1-20) のそれぞれの Step のオルソログの有無については Table 1-18~1-23 に示した通りであり、それらの情報と栄養要求性評価の結果を Table 1-24 にまとめた。オルソログに関しては、KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) の pathway 情報、及び KEGG サイト、DDBJ の GIB サイト (閉鎖中) が提供する Blast 検索 (BLASTP) を参考に精査した。BLASTP における検索元配列には *E. coli* K-12 MG1655 株の Protein Sequence を用い、それらに対する各オルソログの E-value を Table 1-14~1-16 に示した。

**Table 1-18 Orthologs for Thiamin biosynthesis in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
phosphoribosylformyl-glycineamide synthetase	<i>purL</i> (※1)		LAF0127 (2e-30)	LAR0134 (5e-25)		
			LAF0126 (4e-15)	LAR0133 (8e-14)	ND	ND
			LAF0125 (※1)	LAR0132 (※1)		
phosphoribosylaminoimidazole synthetase	<i>purM</i>	LAF0129 (5e-79)	LAR0136 (9e-82)	ND	ND	
HMP-P (※2) synthase	<i>thiC</i>	ND	ND	ND	ND	
HMP (※3) kinase/ HMP-P kinase	<i>thiD</i>	LAF0802 (3e-45)	LAR0969 (9e-55)		LVIS1934 (6e-45)	
		LAF0800 (1e-37)	LAR1205 (2e-43)	LGAS1782 (1e-51)	LVIS2098 (2e-43)	
					LVIS2152 (2e-37)	
hydroxymethylpyrimidine kinase	<i>pdxK</i>	ND	ND	LGAS0738 (2e-12)	ND	
tyrosine lyase	<i>thiH</i>	ND	ND	ND	ND	
1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase	<i>dxs</i>	LAF1005 (2e-90)	LAR0902 (1e-97)	LGAS0350 (2e-82)	ND	
		LAF1632 (2e-42)				
thiazole synthase	<i>thiG</i>	ND	ND	ND	ND	
cysteine desulfurase	<i>iscS</i>		LAF0785 (4e-68)	LAR0583 (1e-64)	LGAS1191 (1e-65)	LVIS1256 (1e-65)
			LAF0489 (9e-63)	LAR0488 (3e-63)	LGAS1224 (4e-59)	LVIS1436 (3e-59)
				LAR0839 (6e-23)		
sulfur source for the thiazole moiety	<i>thiS</i>	ND	ND	ND	ND	
ThiS adenylyltransferase	<i>thiF</i>	LAF1063 (1e-24) (※4)	LAR0940 (4e-32) (※4)	ND	ND	
cysteine sulfur transferase/ carboxy-adenylated-[ThiS sulfur-carrier-protein] sulfurtransferase	<i>thiI</i>	LAF0490 (3e-39)	LAR0489 (7e-30)	LGAS1223 (2e-38)	LVIS1255 (6e-41)	
thiamine phosphate synthase	<i>thiE</i>	LAF0801 (4e-17)	LAR0970 (3e-14)	ND	LVIS2097 (2e-12)	
thiamin monophosphate kinase	<i>thiL</i>	ND	ND	ND	ND	
hydroxyethylthiazole kinase	<i>thiM</i>	LAF0803 (1e-33)	LAR0968 (7e-34)	ND	LVIS2099 (2e-49)	
thiamin kinase	<i>thiK</i>	ND	ND	ND	ND	
thiamine pyrophosphokinase (EC: 2.7.6.2)	ND	LAF1245	LAR1099	LGAS0767	LVIS0959	
thiaminase (EC: 3.5.99.2)	ND	LAF0359	ND	ND	LVIS1830	

ND: not determined

※1 In *E. coli*, phosphoribosylformylglycinamide synthase is composed of a single polypeptide chain, while in *Lactobacilli* three subunits (the orthologs of *purL*, *purQ*, *purS*) are presumed to be required for those function.

※2 HMP-P: 4-amino-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate

※3 HMP: 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine

※4 LAF1063 and LAR0940 are annotated as molybdopterin biosynthesis protein MoeB.

**Table 1-19 Orthologs for Niacin biosynthesis in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E.coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
L-aspartate oxidase	<i>nadB</i>	ND	ND	ND	ND	ND
quinolinate synthase	<i>nadA</i>	ND	ND	ND	ND	ND
quinolinate phosphoribosyltransferase	<i>nadC</i>	ND	ND	ND	ND	ND
nicotinate-mononucleotide adenylyltransferase	<i>nadD</i>	<i>LAF 1305</i> (3e-22)	<i>LAR 1169</i> (2e-26)	<i>LGAS 1403</i> (3e-28)	<i>LVIS 1029</i> (5e-24)	
NMN adenylyltransferase	<i>nadR</i>	ND	ND	ND	ND	ND
NADH pyrophosphatase	<i>nudC</i>	ND	ND	ND	ND	ND
NAD synthetase, NH <sub>3</sub> -dependent	<i>nadE</i>	<i>LAF 0244</i> (4e-113)	<i>LAR 0273</i> (1e-108)	<i>LGAS 1527</i> (6e-118)	<i>LVIS 0544</i> (2e-125)	
NAD kinase	<i>nadK</i>	<i>LAF 0561</i> (3e-18)	<i>LAR 0557</i> (4e-15)	<i>LGAS 1353</i> (9e-18)	<i>LVIS 1472</i> (5e-18)	
pyridine nucleotide transhydrogenase, soluble	<i>sthA</i>	ND	ND	ND	ND	ND
pyridine nucleotide transhydrogenase, $\alpha$ subunit	<i>pntA</i>	ND	ND	ND	ND	ND
pyridine nucleotide transhydrogenase, $\beta$ subunit	<i>pntB</i>	ND	ND	ND	ND	ND
NMN amidohydrolase	<i>pncC</i>	<i>LAF 0510</i> (7e-21)	<i>LAR 0508</i> (3e-20)	ND	<i>LVIS 1238</i> (6e-20)	
nicotinate phosphoribosyltransferase	<i>pncB</i>	<i>LAF 1391</i> (1e-07) <i>LAF 0243</i> (4e-06)	<i>LAF 0148</i> (1e-06) <i>LAF 0272</i> (1e-05)	ND	ND	
purine nucleoside phosphorylase	<i>deoD</i>	ND	<i>LAR 0108</i> (3e-69)	<i>LGAS 1192</i> (2e-04)	<i>LVIS 1593</i> (3e-61)	
inosine-uridine nucleoside (EC: 3.2.2.1)	ND	<i>LAF 1704</i>	<i>LAR 1547</i>	<i>LGAS 0558</i> <i>LGAS 0870</i>	<i>LVIS 1816</i> <i>LVIS 2188</i> <i>LVIS 0403</i>	
5'-ribonucleotidase	<i>ushA</i>	ND	ND	<i>LGAS 0878</i> (1e-15) <i>LGAS 0442</i> (2e-15) <i>LGAS 1067</i> (1e-10)	<i>LVIS 2142</i> (1e-15) <i>LVIS 0040</i> (1e-14) <i>LVIS 1186</i> (4e-10)	
deoxyribonucleoside 5'-monophosphate phosphatase	<i>yfbR</i>	<i>LAF 0351</i> (7e-13)	<i>LAR 0370</i> (7e-12)	<i>LGAS 0083</i> (4e-09)	<i>LVIS 0646</i> (8e-10)	
5'(3')-nucleotidase and polyphosphatase	<i>surE</i>	ND	ND	ND	ND	
pyrimidine nucleotidase	<i>yjjG</i>	ND	ND	<i>LGAS 0027</i> (2e-24)	<i>LVIS 2306</i> (3e-19) <i>LVIS 1351</i> (9e-11)	

ND: not determined

**Table 1-20 Orthologs for Pantothenate and CoA biosynthesis in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E.coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	<i>panB</i>	ND	ND	ND	ND	ND
2-dehydropantoate 2-reductase (acetohydroxy acid isomeroeductase)	<i>ilvC</i>	ND	ND	ND	ND	ND
2-dehydropantoate 2-reductase	<i>panE</i>	<i>LAF 0742</i> (2e-11) <i>LAF 0343</i> (2e-08)	<i>LAR 1750</i> (2e-11) <i>LAR 0338</i> (2e-07)	ND	<i>LVIS 2138</i> (3e-17)	
aspartate 1-decarboxylase	<i>panD</i>	ND	ND	ND	ND	ND
pantothenate synthetase	<i>panC</i>	ND	ND	ND	ND	ND
pantothenate kinase	<i>coaA</i>	<i>LAF 1646</i> (5e-97)	<i>LAR 1512</i> (3e-92)	<i>LGAS 1687</i> (2e-52)	<i>LVIS 1761</i> (3e-88)	
4'-phosphopantothenoylcysteine decarboxylase / phosphopantothenoylcysteine synthetase	<i>dfp</i>	<i>LAF 1253</i> (4e-87)	<i>LAR 1107</i> (9e-86)	<i>LGAS 1278</i> (5e-82)	<i>LVIS 0967</i> (9e-82)	
phosphopantotheine adenylyltransferase	<i>coaD</i>	<i>LAF 0606</i> (8e-42)	<i>LAR 0618</i> (5e-43)	<i>LGAS 1177</i> (2e-35)	<i>LVIS 1399</i> (6e-50)	
dephospho-CoA kinase	<i>coaE</i>	<i>LAF 1315</i> (2e-31)	<i>LAR 1179</i> (1e-32)	<i>LGAS 1419</i> (7e-32)	<i>LVIS 1040</i> (2e-25)	

ND: not determined

**Table 1-21 Orthologs for Vitamin B6 biosynthesis in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E.coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
erythrose 4-phosphate dehydrogenase	<i>epd</i>	<i>LAF0363</i> (5e-76) (※1)	<i>LAR0381</i> (2e-74) (※1)	<i>LGAS1308</i> (4e-79) (※1)	<i>LVIS0661</i> (2e-73) (※1)	
erythronate-4-phosphate dehydrogenase	<i>pdxB</i>	ND	ND	ND	ND	
3-phosphoserine aminotransferase / phosphohydroxythreonine aminotransferase	<i>serC</i>	<i>LAF0768</i> (1e-80)	ND	ND	ND	
4-hydroxy-L-threonine phosphate dehydrogenase	<i>pdxA</i>	ND	ND	ND	ND	
1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase	<i>dxs</i>	<i>LAF1005</i> (2e-90)	<i>LAR0902</i> (1e-97)	<i>LGAS0350</i> (2e-82)	ND	
pyridoxine 5'-phosphate synthase	<i>pdxJ</i>	ND	ND	ND	ND	
pyridoxine 5'-phosphate oxidase / pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	<i>pdxH</i>	ND	ND	ND	ND	
pyridoxal kinase	<i>pdxY</i>					
pyridoxamine kinase / hydroxymethylpyrimidine kinase / pyridoxal kinase	<i>pdxK</i>	<i>LAF0800</i> (3e-08) <i>LAF0938</i> (4e-06) <i>LAF0802</i> (2e-04)	<i>LAR1205</i> (3e-11) <i>LAR0969</i> (6e-06)	<i>LGAS0738</i> (2e-12) <i>LGAS1782</i> (1e-10)	<i>LVIS2098</i> (4e-08) <i>LVIS2152</i> (2e-07) <i>LVIS1934</i> (1e-05)	

ND: not determined

※1 LAF0363, LAR0381, LGAS1308 and LVIS0661 are annotated as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

**Table 1-22 Orthologs for Riboflavin biosynthesis in 4 *Lactobacilli***

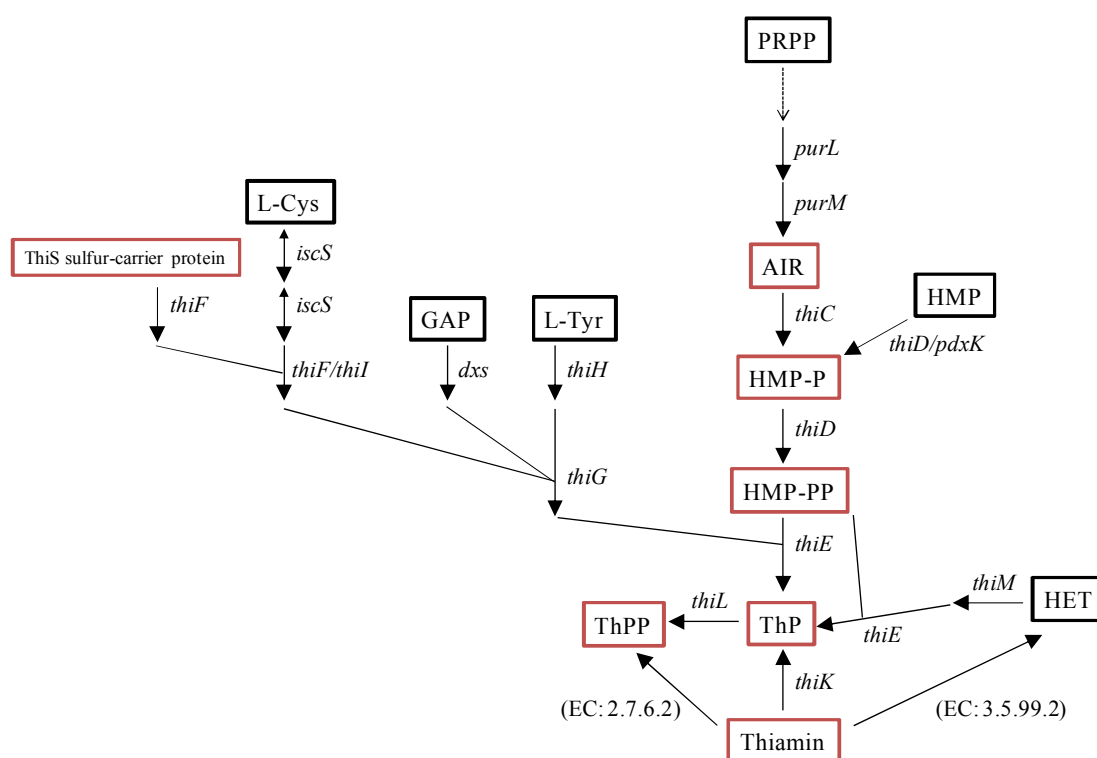
Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E.coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
GTP cyclohydrolase II	<i>ribA</i>		<i>LAF0774</i> (2e-60)	<i>LAR0826</i> (4e-61)	ND	<i>LVIS1651</i> (2e-61)
diaminohydroxyphosphoribosylamino pyrimidine deaminase / 5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase	<i>ribD</i>		<i>LAF0776</i> (1e-64)	<i>LAR0824</i> (4e-57)	ND	<i>LVIS1653</i> (8e-58)
5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil phosphatase	<i>yigB</i>		ND	ND	ND	ND
5-amino-6-(5-phospho-D-ribitylamino)uracil phosphatase	<i>ybjI</i>		<i>LAF1748</i> (7e-54) <i>LAF1111</i> (6e-49)	<i>LAR0912</i> (2e-28) <i>LAR0531</i> (2e-28)	<i>LGAS0486</i> (2e-61) <i>LGAS1724</i> (4e-45) <i>LGAS1377</i> (1e-39)	<i>LVIS0363</i> (2e-46) <i>LVIS1022</i> (2e-34)
3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	<i>ribB</i>		<i>LAF1772</i> (4e-50) <i>LAF0774</i> (1e-43)	<i>LAR0826</i> (4e-44)	ND	<i>LVIS1651</i> (3e-40)
6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	<i>ribE</i>		<i>LAF0773</i> (3e-39)	<i>LAR0827</i> (4e-33)	ND	<i>LVIS1650</i> (2e-35)
riboflavin synthase	<i>ribC</i>		<i>LAF0775</i> (2e-33)	<i>LAR0825</i> (8e-28)	ND	<i>LVIS1652</i> (2e-24)
riboflavin kinase / FMN adenylyltransferase	<i>ribF</i>		<i>LAF0736</i> (3e-41)	<i>LAR0675</i> (1e-41)	<i>LGAS0817</i> (3e-46)	<i>LVIS1332</i> (4e-40)
acid phosphatase	<i>appA</i>		ND	ND	ND	ND
acid phosphatase / phosphotransferase	<i>aphA</i>		ND	ND	ND	ND

ND: not determined

**Table 1-23 Orthologs for Folic acid biosynthesis in 4 *Lactobacilli***

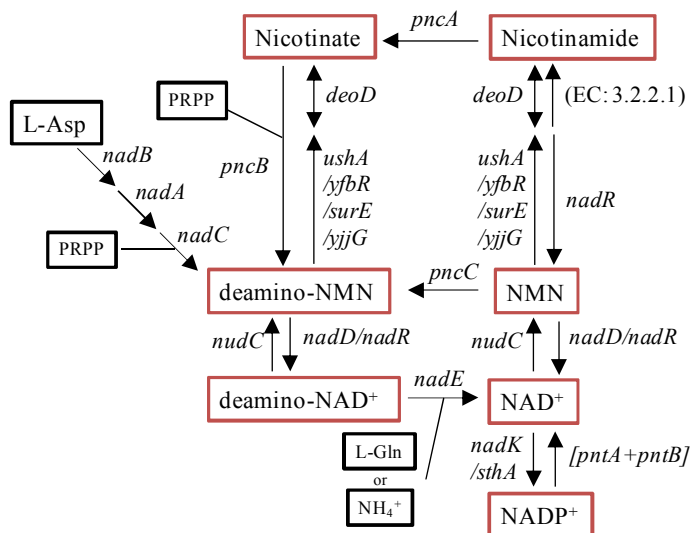
Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)			
		<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>
GTP cyclohydrolase I	<i>folE</i>	<i>LAF 1339</i> (4e-31)	<i>LAR 1211</i> (9e-37)	ND	ND
dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolase	<i>nudB</i>	<i>LAF 1667</i> (2e-05)	<i>LAR 0754</i> (2e-04)	ND	ND
alkaline phosphatase	<i>phoA</i>	ND	ND	ND	ND
dihydroneopterin aldolase	<i>folB</i>	<i>LAF 1341</i> (2e-08)	<i>LAR 1213</i> (3e-07)	ND	ND
6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase	<i>folK</i>	<i>LAF 1340</i> (9e-28)	<i>LAR 1212</i> (1e-30)	ND	ND
4-amino-4-deoxychorismate synthase, subunit	<i>pabA</i>	ND	ND	ND	ND
4-amino-4-deoxychorismate synthase, subunit	<i>pabB</i>	ND	ND	ND	ND
aminodeoxychorismate lyase	<i>pabC</i>	ND	ND	ND	ND
dihydropteroate synthase	<i>folP</i>	<i>LAF 1336</i> (1e-49)	<i>LAR 1208</i> (8e-43)	ND	ND
folypolyglutamate synthetase / dihydrofolate synthetase	<i>folC</i>	<i>LAF 1338</i> (3e-40)	<i>LAR 1210</i> (9e-43)	<i>LGAS 1218</i> (2e-48)	<i>LVIS 1252</i> (5e-46)
dihydroneopterin reductase / dihydrofolate reductase	<i>folM</i>	ND	ND	ND	ND
dihydrofolate reductase	<i>folA</i>	<i>LAF 0888</i> (4e-23)	<i>LAR 0740</i> (2e-25)	<i>LGAS 0831</i> (7e-25)	<i>LVIS 0785</i> (1e-24)

ND: not determined



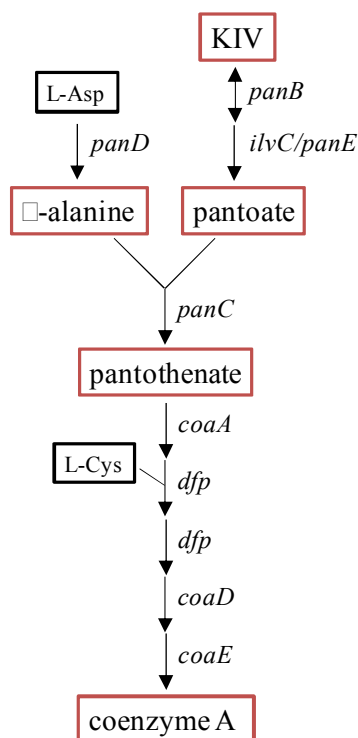
**Fig. 1-15 The biosynthetic pathway for Thiamin in *E. coli***

Abbreviation : GAP, D-glyceraldehyde 3-phosphate; PRPP, 5-phospho- $\alpha$ -D-ribose 1-diphosphate; AIR, 5-amino-1-(5-phospho- $\beta$ -D-ribosyl)imidazole; HMP, hydroxymethylpyrimidine; HMP-P, 4-amino-2-methyl-5-phosphomethylpyrimidine; HMP-PP, 4-amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine; ThP, thiamin phosphate; ThPP, thiamin diphosphate; HET, 4-methyl-5-( $\beta$ -hydroxyethyl)thiazole.



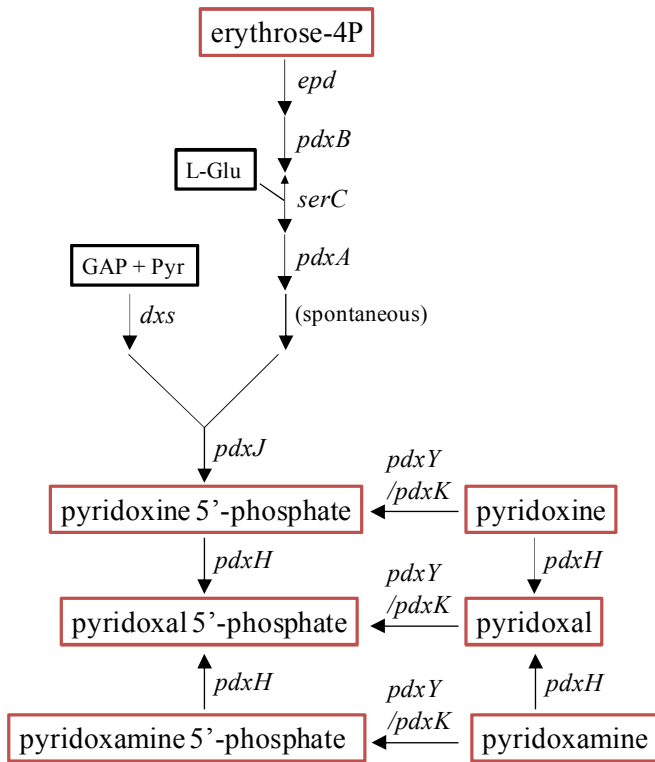
**Fig. 1-16 The biosynthetic pathway for Niacin in *E. coli***

Abbreviation : deamino-NAD<sup>+</sup>, nicotinate adenine dinucleotide; deamino-NMN, β-nicotinate D-ribo nucleotide; NMN, β-nicotinamide D-ribonucleotide.



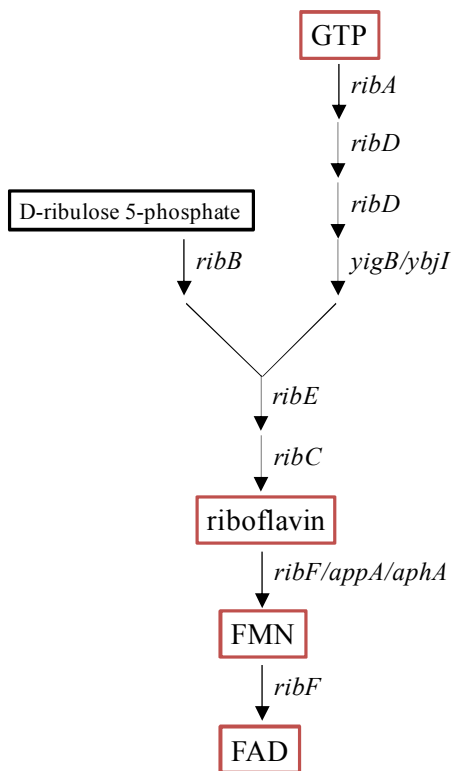
**Fig. 1-17 The biosynthetic pathway for Pantothenate and CoA in *E. coli***

Abbreviation : KIV, 3-methyl-2-oxobutanoate.

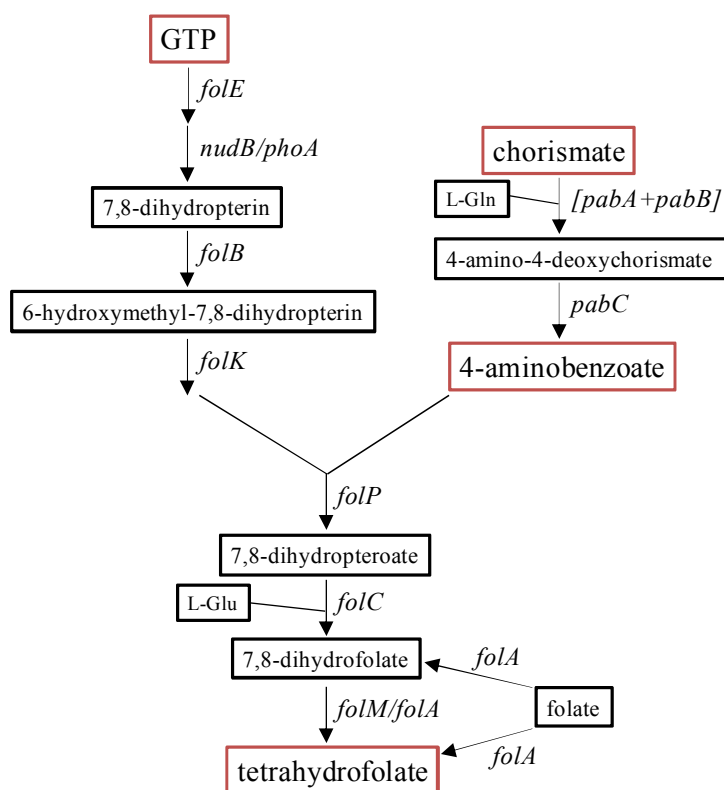


**Fig. 1-18 The biosynthetic pathway for Vitamin B6 in *E. coli***

Abbreviation : erythrose-4P, D-erythrose 4-phosphate; GAP, D-glyceraldehyde 3-phosphate.



**Fig. 1-19 The biosynthetic pathway for Riboflavin in *E. coli***



**Fig. 1-20 The biosynthetic pathway for Folic acid in *E. coli***

**Table 1-24 The summary of the assay of vitamin auxotrophy and the information of genome database in 4 *Lactobacilli***

Omitted Vitamins	<i>L. fermentum</i>		<i>L. reuteri</i>		<i>L. gasseri</i>		<i>L. brevis</i>	
	growth test	database	growth	database	growth	database	growth	database
Thiamin	N	impossible	N	impossible	<b><u>V</u></b>	<b><u>impossible</u></b>	N	impossible
Niacin	N	impossible	N	impossible	N	impossible	N	impossible
Pantothenate + CoA	N	impossible	N	impossible	N	impossible	N	impossible
Vitamin B6	<b><u>S</u></b>	<b><u>impossible</u></b>	N	impossible	N	impossible	N	impossible
Riboflavin	V	possible	V	possible	<b><u>S</u></b>	<b><u>impossible</u></b>	V	possible
Folic acid + <i>p</i> -Aminobenzoate	<b><u>V</u></b>	<b><u>impossible</u></b>	<b><u>V</u></b>	<b><u>impossible</u></b>	<b><u>S</u></b>	<b><u>impossible</u></b>	N	impossible

※1 The results of growth tests were represented by the following abbreviation: V, viable; N, nonviable; S, stimulus.

'S' means that a certain vitamin stimulate the growth of a lactic acid bacterium and final OD grown without the vitamin is 30 to 70% of that grown with the vitamin.

※2 The case that all genes required for byosynthesis of an amino acid are exist in genome database is represented by "possible", while the case that more than one gene are missig is represented by "impossible".

※3 Bold and underlined type represent the discrepancy between the results of growth test and the information in genome database.

結論としては、要求性評価結果とゲノムデータベースの結果はほぼすり合う形となったが、「ゲノム上では生合成遺伝子が揃っていないが、非要求性」となった結果が幾つか存在した。ビタミンの場合、それを含まない培地で生育は認められるが、それを含む培地と比べ生育が悪化することがあり、Table 1-24 では「S」と表記した。

### 1-2-9. ビタミン要求性評価結果 *-L. fermentum, L. reuteri-*

*L. fermentum* 及び *L. reuteri* について、Table 1-23 に示したように各ゲノム上にはコリスミ酸から *p*-アミノ安息香酸 (PABA) までの 3 遺伝子 : *pabABC* のオルソログが存在しないにも関わらず、葉酸や PABA を含まない培地でコントロールと同程度の生育を示したことから、PABA の新規生合成経路が存在する可能性が示唆された。このことについては、*L. fermentum* に絞り更に詳細な解析を行った結果を、第 2 章にて記述する。

また、*L. fermentum* のビタミン B6 に関して、ゲノム上に生合成遺伝子を備えていないにも関わらず、ビタミン B6 を含む培地には劣るものの、含まない培地においても生育が認められた (OD<sub>550</sub>≒50% (vs. +PLP 培地))。ビタミン B6 は主にアミノ基転移などアミノ酸生合成において重要なビタミンである。ビタミン B6 非存在下でアミノ酸を増量 (各アミノ酸 0.4 g/L) した培地で生育評価を行った結果、コントロール (各アミノ酸 0.1 g/L、PLP を含む) の約 80% まで生育の向上が認められた。このことは、ビタミン B6 が存在することでアミノ酸生合成経路の一部が活性化され生育向上効果がもたらされていることを示唆しており、更には *L. fermentum* は実際にはビタミン B6 を生合成できていないことを示唆すると考えられる。*L. fermentum* は、比較的多くのアミノ酸生合成遺伝子を備えている (少なくとも今回比較した 4 株の中では最も生合成可能なアミノ酸の数が多い (Table 1-12)) ため、今回の生育評価の中で、ビタミン B6 の「添加効果」が表に現れたことが推察される。逆を言えば、*L. fermentum* 以外の 3 株は、ビタミン B6 を加えてもアミノ酸が積極的に生合成されることがなく、生育は向上しなかったのではないだろうか。このように考えた場合、ビタミン B6 を必要とする全てのアミノ酸生合成 (酵素反応) を自身で達成できる菌株 (或いはそのように改変された菌株) で、且つ培地にそれらのアミノ酸を含まない状態でない限りは、生育評価でビタミン B6 が生合成されているかどうかを判断するのは困難と考えられる。ビタミン B6 が必要な (PLP を補因子とする) アミノ酸代謝系のオルソログを Table 1-25 に示したが、いずれの菌株もそれを必要とする全ての代謝経路を備えているわけではないため、そもそもビタミン B6 の要求性を評価することはできなかつたと考えることができる。

しかしながら、ビタミン B6 非存在下でも生育が認められたことを最も簡単に捉えるなら、異なる経路 (新規生合成経路) でビタミン B6 が供給されている可能性も排除することはできない。

なお、その他のビタミンに関してはゲノム情報と要求性評価の結果は一致した。



### 1-2-10. ビタミン要求性評価結果 - *L. gasseri*, *L. brevis*-

*L. gasseri* に関してはリボフラビン或いは葉酸を除いた培地において、コントロール（リボフラビン或いは葉酸を含む培地）には劣るものの生育が認められた（OD≒60~70%）。Table 1-27、1-28、1-29 に示したが、*L. gasseri* は FAD や葉酸を必要とするオルソログを多数備えているため、それらのビタミンは生育に必須であると考えられる。Table 1-22 や 1-23 に示したように、*L. gasseri* はそれらの生合成に必要な遺伝子の一部しか備えていないため、*L. gasseri* がリボフラビンや葉酸を含まない培地でも生育したという事実は、リボフラビン及び葉酸が新規経路で生合成されている可能性を示唆する。しかしながら、一方で、前項で論じたビタミン B6 とアミノ酸の関係と同様の考察も可能ではある。つまり、リボフラビンや葉酸を加えなくとも他のアミノ酸、核酸系物質、ビタミンにより生育に必要な代謝経路を動かすことが可能であり、リボフラビンや葉酸を加えることで *L. gasseri* の生育が旺盛になるのかもしれない。

*L. gasseri* に関してはチアミンに関しても、Table 1-18 に示したように生合成に必要なオルソログのセットを備えていないのにも関わらず、チアミンを含まない培地においても、それを含む培地と同等の生育を示した。Table 1-30 に示したように、*L. gasseri* は、それらの機能にチアミンを必要とする酵素を幾つか備えているが、他の 3 株と比べると *L. gasseri* のみ *sucB* や *aceF* オルソログを有していない。他の 3 株が持つそれらのオルソログは、ゲノムデータベース上では実際はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の subunit とアノテーションされている（それぞれ *LAF1137~LAF1140*、*LAR0608~LAR0611*、*LVIS1407~LVIS1410* が複合体を形成すると推測されている）。しかしながら、今回評価した *Lactobacillus* 属 4 株の中で *L. gasseri* のみ、それらのオルソログを有していない。チアミンの生育に影響をもたらすのが、このピルビン酸複合体に対してだとすると（つまり、*L. gasseri* は生育にピルビン酸複合体を必要としないとすると）、培地にチアミンを含んでも含まなくても同等の生育を示すと考えられる。*L. gasseri* は他の 3 株と比べると Fig. 1-2 に示すように LSP 培地での OD 値が最も低かったが、このこととピルビン酸デヒドロゲナーゼを有していないことは関連があるのかもしれない（acetyl-CoA 供給面で不利だと考えられる）。

*L. brevis* に関してはゲノムデータベースと要求性評価の結果は一致し、新規経路の可能性はないと考えられた。

**Table 1-25 PLP-requiring Orthologs for their functions in 4 *Lactobacilli* (1)**

Amino Acids	Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)			
			<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>
Cysteine	D-cysteine desulfhydrase	<i>dcyD</i>	ND	ND	ND	ND
Cysteine Alanine	L-cysteine desulfurase	<i>sufS</i>	<i>LAF1094</i> (5e-140)	<i>LAR0839</i> (2e-145)	ND	ND
Cysteine Alanine	cysteine desulfurase	<i>iscS</i>	<i>LAF0785</i> (4e-68) <i>LAF0489</i> (9e-63)	<i>LAR0583</i> (1e-64) <i>LAR0488</i> (3e-63) <i>LAR0839</i> (6e-23)	<i>LGAS1191</i> (1e-65) <i>LGAS1224</i> (4e-59)	<i>LVIS1256</i> (1e-65) <i>LVIS1436</i> (3e-59)
Cysteine Serine	cysteine synthase	<i>cysM</i>	<i>LAF0346</i> (3e-49) <i>LAF0974</i> (2e-32)	<i>LAR1677</i> (6e-54) <i>LAR1459</i> (1e-30)	ND	ND
Cysteine Serine	O-acetylserine sulfhydrylase	<i>cysK</i>	<i>LAF0346</i> (2e-65) <i>LAF0974</i> (2e-37)	<i>LAR1677</i> (3e-67) <i>LAR1459</i> (2e-36)	ND	ND
Cysteine Aspartate Methionine	O-succinylhomoserine(thiol)-lyase / O-succinylhomoserine lyase	<i>metB</i>	<i>LAF0973</i> (9e-77) <i>LAF0814</i> (6e-69) <i>LAF0815</i> (4e-60)	<i>LAR0281</i> (3e-79)	ND	ND
Cysteine Aspartate Methionine	cystathionine β-lyase / L-cysteine desulfhydrase	<i>malY</i>	<i>LAF0942</i> (4e-56)	<i>LAR1793</i> (6e-64)	ND	<i>LVIS0300</i> (4e-59)
Cysteine Aspartate Methionine	cystathionine β-lyase / L-cysteine desulfhydrase	<i>metC</i>	<i>LAF0973</i> (1e-47) <i>LAF0814</i> (4e-41) <i>LAF0815</i> (2e-37)	<i>LAR0281</i> (2e-44)	ND	ND
Arginine Glutamate	succinylornithine transaminase	<i>astC</i>	<i>LAF0723</i> (7e-78) <i>LAF1619</i> (1e-32)	<i>LAR0189</i> (3e-43) <i>LAR1588</i> (4e-33)	ND	ND
Arginine Glutamate	putrescine aminotransferase	<i>patA</i>	<i>LAF0723</i> (7e-55) <i>LAF1619</i> (2e-44)	<i>LAR0189</i> (1e-49) <i>LAR1588</i> (2e-25)	ND	ND
Arginine	ornithine decarboxylase	<i>speF</i>	ND	ND	<i>LGAS1881</i> (0.0)	ND
Arginine	ornithine decarboxylase	<i>speC</i>	ND	ND	<i>LGAS1881</i> (0.0)	ND
Arginine	arginine decarboxylase	<i>adiA</i>	ND	ND	<i>LGAS1881</i> (1e-89)	ND
Arginine	arginine decarboxylase	<i>speA</i>	ND	ND	ND	ND
Arginine Lysine Glutamate	acetylornithine aminotransferase / <i>N</i> -succinyldiaminopimelate aminotransferase	<i>argD</i>	<i>LAF0723</i> (7e-61) <i>LAF0031</i> (※1) <i>LAF0136</i> (※1) <i>LAF0859</i> (※1)	<i>LAR0041</i> (※1) <i>LAR0597</i> (※1) <i>LAR0715</i> (※1) <i>LAR1133</i> (※1)	ND	ND
Arginine Glutamate	4-aminobutyrate transaminase	<i>gabT</i>	<i>LAF1619</i> (2e-65)	<i>LAR0189</i> (1e-67)	ND	ND
Arginine Glutamate	4-aminobutyrate aminotransferase	<i>puuE</i>	<i>LAF1619</i> (2e-61)	<i>LAR0189</i> (9e-64)	ND	ND
Methionine	methionine-oxo-acid transaminase	<i>ybdL</i>	<i>LAF0859</i> (2e-50) <i>LAF0136</i> (6e-48) <i>LAF0031</i> (3e-40) <i>LAF1051</i> (1e-35) <i>LAF1103</i> (1e-30) <i>LAF0342</i> (2e-27)	<i>LAR0715</i> (2e-47) <i>LAR0597</i> (2e-46) <i>LAR1133</i> (3e-44) <i>LAR0041</i> (3e-39) <i>LAR0037</i> (6e-27)	<i>LGAS1128</i> (1e-36)	<i>LGAS0855</i> (1e-28)
Methionine	7,8-diaminopelargonic acid synthase	<i>bioA</i>	<i>LAF0723</i> (2e-31) <i>LAF1619</i> (2e-30)	<i>LAR0189</i> (2e-37)	ND	ND
Lysine	lysine decarboxylase	<i>cadA</i>	ND	ND	<i>LGAS1881</i> (6e-86)	ND
Lysine	lysine decarboxylase	<i>ldcC</i>	ND	ND	<i>LGAS1881</i> (1e-90)	ND
Lysine	lysine 2,3-aminomutase	<i>epmB</i>	ND	ND	ND	ND
Lysine	diaminopimelate decarboxylase	<i>lysA</i>	<i>LAF0854</i> (4e-38)	<i>LAR0592</i> (1e-40)	ND	ND
Valine Alanine	valine-pyruvate aminotransferase	<i>avtA</i>	<i>LAF1013</i> (1e-17)	<i>LAR0299</i> (1e-17)	ND	<i>LVIS2087</i> (1e-12)
Valine Leucine Isoleucine Phenylalanine Glutamate	branched-chain amino-acid aminotransferase	<i>ihvE</i>	<i>LAF0347</i> (2e-30) <i>LAF0922</i> (6e-30)	ND	ND	ND
Tyrosin Phenylalanine Leucine Glutamate	tyrosine aminotransferase	<i>tyrB</i>	ND	ND	ND	ND
Tryptophan Cysteine	tryptophanase / L-cysteine desulfhydrase	<i>tnaA</i>	ND	ND	ND	ND
Tryptophan Serine	tryptophan synthase	<i>trpA</i>	ND	ND	ND	ND
Tryptophan Serine	tryptophan synthase	<i>trpB</i>	ND	ND	ND	ND

ND: not determined

※1 cf. Table 1-10 ※2

※2 No hits in blast search but annotated genes are exist in genome database.

**Table 1-26 PLP-requiring Orthologs for their functions in 4 *Lactobacilli* (2)**

Amino Acids	Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)			
			<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>
Threonine	threonine synthase	<i>thrC</i>	<i>LAF1144</i> (8e-45)	ND	<i>LGAS1076</i> (6e-47)	ND
Threonine Isoleucine	threonine deaminase	<i>ihvA</i>	ND	ND	ND	ND
Threonine Serine	threonine dehydratase	<i>tdcB</i>	ND	ND	ND	ND
Threonine Glycine	L-threonine aldolase	<i>ltaE</i>	ND	ND	ND	ND
Threonine Glycine	2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase	<i>kbl</i>	ND	ND	ND	ND
Serine Glutamate	3-phosphoserine aminotransferase / phosphohydroxythreonine aminotransferase	<i>serC</i>	<i>LAF0768</i> (1e-80)	ND	ND	ND
Serine	D-serine ammonia-lyase	<i>dsdA</i>	<i>LAF0744</i> (3e-140)	ND	ND	ND
Serine Glycine Alanine	serine hydroxymethyltransferase	<i>glyA</i>	<i>LAF0430</i> (e-134)	<i>LAR0445</i> (e-129)	<i>LGAS0256</i> (e-131)	<i>LVIS1287</i> (e-126)
Glycine	glycine decarboxylase	<i>gcvP</i>	ND	ND	ND	ND
Glutamate	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	<i>hemL</i>	<i>LAF0723</i> (3e-30) <i>LAF1619</i> (1e-29)	<i>LAR1588</i> (6e-157) <i>LAR0189</i> (5e-34)	ND	ND
Glutamate	glutamate decarboxylase	<i>gadB</i>	ND	ND	ND	<i>LVIS1847</i> (e-109) <i>LVIS0079</i> (1e-84)
Glutamate	glutamate decarboxylase	<i>gadA</i>	ND	ND	ND	<i>LVIS1847</i> (e-109) <i>LVIS0079</i> (5e-84)
Glutamate	UDP-L-Ara4O C-4" transaminase	<i>arnB</i>	ND	ND	ND	ND
Glutamate	dTDP-4-dehydro-6-deoxy-D- glucose transaminase	<i>rffA</i>	ND	ND	ND	ND
Aspartate Glutamate Phenylalanine Tyrosine Cysteine	aspartate aminotransferase	<i>aspC</i>	<i>LAF1051</i> (※2) <i>LAF1103</i> (※2)	<i>LAR0597</i> (※2)	<i>LGAS1128</i> (※2)	<i>LVIS0855</i> (※2)
Alanine	alanine racemase	<i>dadX</i>	<i>LAF0211</i> (1e-39)	<i>LAR0245</i> (4e-40)	<i>LGAS0267</i> (5e-31)	<i>LVIS0508</i> (8e-45)
Alanine	8-amino-7-oxononanoate synthase	<i>bioF</i>	ND	ND	ND	ND
Alanine	cysteine sulfinate desulfinase	<i>csdA</i>	<i>LAF1094</i> (3e-100) <i>LAF0785</i> (1e-25) <i>LAF0489</i> (2e-06)	<i>LAR0839</i> (2e-108) <i>LAR0583</i> (2e-21) <i>LAR0488</i> (9e-13)	<i>LGAS1191</i> (1e-25) <i>LGAS1224</i> (8e-15)	<i>LVIS1436</i> (6e-18) <i>LVIS1256</i> (7e-12)

ND: not determined

※1 cf. Table 1-10 ※2

※2 No hits in blast search but annotated genes are exist in genome database.

**Table 1-27 FAD-requiring Orthologs for their functions in 4 *Lactobacilli* (1)**

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E.coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
5-carboxymethylaminomethyluridine-tRNA synthase, subunit	<i>mmnE</i>		LAF 1839 (7e-83)	LAR 1816 (9e-79)	LGAS 1895 (5e-74)	LVIS 2310 (8e-78)
5-carboxymethylaminomethyluridine-tRNA synthase, subunit	<i>mmnG</i>		LAF 1838 (0.0)	LAR 1815 (0.0)	LGAS 1894 (0.0)	LVIS 2309 (0.0)
UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase	<i>murB</i>		LAF 0378 (1e-17)	LAR 0398 (2e-19)	LGAS 1293 (2e-13)	LVIS 0681 (5e-16)
thioredoxin reductase	<i>trxB</i>		LAF 0410 (4e-52)	LAR 0365 (8e-68)	LGAS 1325 (8e-68)	LVIS 0645 (1e-67)
			LAF 1703 (5e-22)	LAR 1018 (6e-55)	LGAS 0447 (5e-15)	LVIS 1813 (5e-18)
sulfite reductase, subunit / flavin reductase	<i>cysJ</i>		ND	ND	ND	ND
sulfite reductase, subunit	<i>cysI</i>		ND	ND	ND	ND
succinate dehydrogenase, subunit	<i>sdhA</i>		LAF 0986 (2e-14)	LAR 1439 (1e-27)	LGAS 0848 (4e-32)	ND
					LGAS 0049 (6e-14)	LGAS 0505 (0.079)
succinate dehydrogenase, subunit	<i>sdhB</i>		ND	ND	ND	ND
succinate dehydrogenase, subunit	<i>sdhC</i>		ND	ND	ND	ND
succinate dehydrogenase, subunit	<i>sdhD</i>		ND	ND	ND	ND
N-methyltryptophan oxidase	<i>solA</i>		ND	ND	ND	ND
pyruvate dehydrogenase, subunit	<i>aceE</i>		ND	ND	ND	ND
pyruvate dehydrogenase, subunit	<i>aceF</i>		LAF 1138 (5e-53)	LAR 0610 (5e-54)	ND	LVIS 1408 (3e-54)
pyruvate dehydrogenase, subunit / lipoamide dehydrogenase / 2-oxoglutarate dehydrogenase, subunit	<i>lpd</i>		LAF 1137 (3e-114)	LAR 0611 (2e-100)	LGAS 1554 (4e-49)	LVIS 1407 (1e-94)
proline dehydrogenase	<i>putA</i>		LAF 0045 (2e-26)	LAR 0033 (8e-28)	LGAS 1626 (5e-25)	LVIS 0323 (9e-26)
nitrite reductase, subunit	<i>nirD</i>		ND	ND	ND	ND
nitrite reductase, subunit	<i>nirB</i>		ND	ND	ND	ND
NADH:ubiquinone oxidoreductase II	<i>ndh</i>		LAF 1086 (2e-28)	LAR 0495 (2e-35)	ND	LVIS 0320 (2e-30)
L-aspartate oxidase	<i>nadB</i>		ND	ND	ND	ND
glyoxylate carboligase	<i>gcl</i>		LAF 1022 (6e-44)	LAR 0126 (9e-45)	LGAS 1893 (3e-54)	LVIS 0313 (1e-51)
				LAR 0481 (5e-24)	LGAS 0248 (9e-26)	LVIS 0491 (1e-36)
glutathione reductase	<i>gor</i>		LAF 1615 (1e-48)	LAR 1327 (6e-51)	LGAS 0040 (2e-41)	LVIS 2051 (3e-49)
glutamate synthase, subunit	<i>gltD</i>		ND	ND	ND	ND
glutamate synthase, subunit	<i>gltB</i>		ND	ND	ND	ND
UDP-galactopyranose mutase	<i>glf</i>		LAF 1416 (6e-171)	LAR 1293 (2e-163)	LGAS 1143 (6e-171)	ND
					LGAS 0848 (2e-31)	LGAS 0049 (1e-20)
fumarate reductase, subunit	<i>frdA</i>		LAF 0986 (3e-20)	LAR 1439 (1e-30)	LGAS 0904 (0.11)	ND
fumarate reductase, subunit	<i>frdB</i>		ND	ND	ND	ND
fumarate reductase, subunit	<i>frdC</i>		ND	ND	ND	ND
fumarate reductase, subunit	<i>frdD</i>		ND	ND	ND	ND
malate:quinone oxidoreductase	<i>mgo</i>		ND	ND	ND	ND
NADH oxidoreductase	<i>hcr</i>		ND	ND	ND	ND
alkylhydroperoxide reductase, subunit	<i>ahpC</i>		LAF 0409 (9e-71)	LAR 1019 (2e-71)	ND	LVIS 0086 (6e-71)
alkylhydroperoxide reductase, subunit	<i>ahpF</i>		LAF 0410 (1e-46)	LAR 1018 (8e-43)	LGAS 1325 (4e-49)	LVIS 0645 (3e-51)
NADPH quinone reductase	<i>mdaB</i>		LAF 0635 (0.021)	LAR 1689 (0.002)	LGAS 0447 (4e-15)	LVIS 1813 (8e-13)
			LAF 1813 (0.083)			LVIS 1936 (0.022)
nitric oxide dioxygenase / dihydropteridine reductase	<i>hmp</i>		ND	ND	ND	ND
acetoin synthesis / pyruvate oxidase	<i>poxB</i>		LAF 1022 (2e-45)	LAR 0126 (9e-43)	LGAS 1893 (1e-78)	LVIS 0313 (1e-80)
D-lactate dehydrogenase	<i>dld</i>		LAF 1770 (4e-176)	ND	ND	ND
dihydropteridine reductase / NAD(P)H nitroreductase	<i>nfsB</i>		ND	ND	ND	ND
D-amino acid dehydrogenase	<i>dada</i>		ND	ND	ND	ND

ND: not determined

**Table 1-28 FAD-requiring Orthologs for their functions in 4 *Lactobacilli* (2)**

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)			
		<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>
acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase, subunit	<i>ilvB</i>	<i>LAF1022</i> (2e-56)	<i>LAR0126</i> (9e-52)	<i>LGAS1893</i> (2e-58)	<i>LVIS0313</i> (1e-55) <i>LVIS0491</i> (1e-52)
acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase, subunit	<i>ilvN</i>	ND	ND	ND	ND
acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase, subunit	<i>ilvG</i> (※)	<i>LAF1022</i> (6e-54)	<i>LAR0126</i> (6e-51)	<i>LGAS1893</i> (1e-52)	<i>LVIS0313</i> (1e-54) <i>LVIS0491</i> (7e-47)
acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase, subunit	<i>ilvM</i>	ND	ND	ND	ND
acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase, subunit	<i>ilvI</i>	<i>LAF1022</i> (7e-39)	<i>LAR0126</i> (1e-44)	<i>LGAS1893</i> (3e-49)	<i>LVIS0313</i> (2e-50) <i>LVIS0491</i> (1e-49)
acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase, subunit	<i>ilvH</i>	ND	ND	ND	ND
2-oxoglutarate dehydrogenase, subunit	<i>sucA</i>	ND	ND	ND	ND
2-oxoglutarate dehydrogenase, subunit	<i>sucB</i>	<i>LAF1138</i> (2e-44)	<i>LAR0610</i> (1e-51)	ND	<i>LVIS1408</i> (4e-50)
ring 1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit	<i>paaE</i>	ND	ND	ND	ND
ring 1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit	<i>paaA</i>	ND	ND	ND	ND
ring 1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit	<i>paaC</i>	ND	ND	ND	ND
ring 1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit	<i>paaB</i>	ND	ND	ND	ND
L-2-hydroxyglutarate oxidase	<i>lhgO</i>	ND	ND	ND	ND
1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4- diphosphate reductase	<i>ispH</i>	ND	ND	ND	ND
pyridine nucleotide transhydrogenase	<i>sthA</i>	ND	ND	ND	ND
crotonobetainyl-CoA reductase	<i>caiA</i>	ND	ND	ND	<i>LVIS1909</i> (3e-24)
5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	<i>metF</i>	ND	ND	ND	ND
flavodoxin NADP <sup>+</sup> reductase	<i>fpr</i>	ND	ND	ND	ND
flavorubredoxin reductase	<i>norW</i>	ND	<i>LAR0064</i> (3e-29)	ND	ND
2,4-dienoyl-CoA reductase	<i>fadH</i>	ND	ND	ND	<i>LVIS2184</i> (5e-27)

※ *E. coli* B REL606

ND: not determined

**Table 1-29 Tetrahydrofolate or 5, 10-methylenetetrahydrofolate-requiring Orthologs for their functions in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
glycine decarboxylase	<i>gcvP</i>		ND	ND	ND	ND
glycine cleavage system H protein	<i>gcvH</i>		<i>LAF0449</i> (1e-06)	<i>LAR0463</i> (2e-16)	ND	<i>LVIS1951</i> (2e-12) <i>LVIS1271</i> (2e-12) <i>LVIS1737</i> (7e-04)
aminomethyltransferase	<i>gcvT</i>		ND	ND	ND	ND
lipoamide dehydrogenase	<i>lpd</i>		<i>LAF1137</i> (1e-91)	<i>LAR0661</i> (7e-82)	<i>LGAS1554</i> (2e-41)	<i>LVIS1407</i> (4e-78)
cobalamin-dependent methionine synthase	<i>metH</i>		<i>LAF0828</i> (3e-15)	<i>LAR0993</i> (5e-11)	ND	ND
5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	<i>metF</i>		ND	ND	ND	ND
formyltetrahydrofolate deformylase	<i>purU</i>		<i>LAF0130</i> (2e-18)	<i>LAR0137</i> (6e-17)	ND	ND
phosphoribosylglycinamide formyltransferase	<i>purN</i>		<i>LAF0130</i> (3e-30)	<i>LAR0137</i> (3e-35)	ND	ND
AICAR (※1) transformylase	<i>purH</i>		<i>LAF0131</i> (e-133)	<i>LAR0138</i> (e-140)	ND	ND
UDP-L-Ara4N formyltransferase / UDP-GlcA C-4"-decarboxylase	<i>arnA</i>		<i>LAF1251</i> (1e-30)	<i>LAR1105</i> (1e-27)	<i>LGAS0761</i> (6e-38)	<i>LVIS0965</i> (4e-30)
10-formyltetrahydrofolate:L-methionyl-tRNA <sup>Met</sup> N-formyltransferase	<i>fnt</i>		<i>LAF1251</i> (1e-61)	<i>LAR1105</i> (3e-63)	<i>LGAS0761</i> (3e-76)	<i>LVIS0965</i> (6e-70)
serine hydroxymethyltransferase	<i>glyA</i>		<i>LAF0430</i> (e-134)	<i>LAR0445</i> (e-129)	<i>LGAS0256</i> (e-131)	<i>LVIS1287</i> (e-126)
3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	<i>panB</i>		ND	ND	ND	ND
thymidylate synthase	<i>thyA</i>		<i>LAF0887</i> (6e-86)	<i>LAR0739</i> (4e-85)	<i>LGAS0830</i> (8e-76)	<i>LVIS0784</i> (3e-86)
5-carboxymethylaminomethyluridine-tRNA synthase, subunit	<i>mmE</i>		<i>LAF1839</i> (7e-83)	<i>LAR1816</i> (9e-79)	<i>LGAS1895</i> (5e-74)	<i>LVIS2310</i> (8e-78)
5-carboxymethylaminomethyluridine-tRNA synthase, subunit	<i>mmG</i>		<i>LAF1838</i> (0.0)	<i>LAR1815</i> (0.0)	<i>LGAS1894</i> (0.0)	<i>LVIS2309</i> (0.0)
5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/ 5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase	<i>folD</i>		<i>LAF1263</i> (4e-81)	<i>LAR1116</i> (5e-71)	<i>LGAS0751</i> (1e-72)	<i>LVIS0978</i> (1e-81)
folypolyglutamate synthase / dihydrofolate synthase	<i>folC</i>		<i>LAF1338</i> (3e-40)	<i>LAR1210</i> (9e-43)	<i>LGAS1218</i> (2e-48)	<i>LVIS1252</i> (5e-46)

ND: not determined

※1 Abbreviation: AICAR, 5-amino-1-(5-phospho-D-ribosyl)imidazole-4-carboxamide.

**Table 1-30 Thiamin-requiring Orthologs for their functions in 4 *Lactobacilli***

Enzyme function	Gene for biosynthesis	Orthologs (E-value)				
		<i>E. coli</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. brevis</i>
2-oxoglutarate decarboxylase, subunit	<i>sucA</i>		ND	ND	ND	ND
2-oxoglutarate decarboxylase, subunit	<i>sucB</i>		<i>LAF1138</i> (2e-44)	<i>LAR0610</i> (1e-51)	ND	<i>LVIS1408</i> (4e-50)
lipoamide dehydrogenase	<i>lpd</i>		<i>LAF1137</i> (1e-91)	<i>LAR0661</i> (7e-82)	<i>LGAS1554</i> (2e-41)	<i>LVIS1407</i> (4e-78)
transketolase I	<i>tktA</i>		<i>LAF1721</i> (0.0)			<i>LVIS1420</i> (0.0)
pyruvate dehydrogenase, subunit	<i>aceE</i>		ND	ND	ND	ND
pyruvate dehydrogenase, subunit	<i>aceF</i>		<i>LAF1138</i> (5e-53)	<i>LAR0610</i> (5e-54)	ND	<i>LVIS1408</i> (3e-54)
pyruvate:flavodoxin oxidoreductase	<i>ydbK</i>		ND	ND	ND	ND
glyoxylate carboligase	<i>gcl</i>		<i>LAF1022</i> (6e-44)	<i>LAR0126</i> (9e-45) <i>LAR0481</i> (5e-24)	<i>LGAS1893</i> (3e-54) <i>LGAS0248</i> (9e-26)	<i>LVIS0313</i> (1e-51) <i>LVIS0491</i> (1e-36)
2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase	<i>menD</i>		ND	ND	ND	ND
acetoin synthesis / pyruvate oxidase	<i>poxB</i>		<i>LAF1022</i> (2e-45)	<i>LAR0126</i> (9e-43)	<i>LGAS1893</i> (1e-78)	<i>LVIS0313</i> (1e-80) <i>LVIS0491</i> (8e-36)
	<i>ilvB</i>		<i>LAF1022</i> (2e-56)	<i>LAR0126</i> (9e-52)	<i>LGAS1893</i> (2e-58)	<i>LVIS0313</i> (1e-55) <i>LVIS0491</i> (1e-52)
	<i>ilvN</i>		ND	ND	ND	ND
Subunit of acetohydroxybutanoate synthase / acetolactate synthase	<i>ilvG</i> (※)		<i>LAF1022</i> (6e-54)	<i>LAR0126</i> (6e-51)	<i>LGAS1893</i> (1e-52)	<i>LVIS0491</i> (1e-54) <i>LVIS0313</i> (7e-47)
	<i>ilvM</i>		ND	ND	ND	ND
	<i>ilvI</i>		<i>LAF1022</i> (7e-39)	<i>LAR0126</i> (1e-44)	<i>LGAS1893</i> (3e-49)	<i>LVIS0313</i> (2e-50) <i>LVIS0491</i> (1e-49)
	<i>ilvH</i>		ND	ND	ND	ND
1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase	<i>dxs</i>		<i>LAF1005</i> (2e-90) <i>LAF1632</i> (2e-42)	<i>LAR0902</i> (1e-97)	<i>LGAS0350</i> (2e-82)	ND

※ *E. coli* B REL606

ND: not determined

## 1-3. 考察

### 1-3-1. *Lactobacillus* 属 4 株における新規生合成経路の可能性

前項までに記したように、*L. fermentum*、*L. reuteri*、*L. gasseri*、*L. brevis* を対象に新規生合成経路の探索を行った結果、以下に記すように新規生合成経路の可能性を期待させる幾つかの結果を得ることができた。

#### I. アミノ酸

##### (i) *L. fermentum* IFO 3956

アミノ酸の Single-omission 解析により、*L. fermentum* は、ヒスチジン、セリン、システイン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、アスパラギン、リジン、グルタミン酸、グルタミン、プロリンに対しては非要求性を示したが、このうちグルタミン酸及びセリン、システインの生合成について、既知酵素に対するオルソログのセットの一部が備わっておらず、新規経路が存在する可能性が期待された。

グルタミン酸は、2-oxoglutarate よりグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (*gdhA*, EC 1.4.1.4) より生合成される、またはグルタミンよりグルタミナーゼ (EC 3.5.1.2) により生成するのが一般的だが、*L. fermentum* にはそれらのオルソログが存在しないのにも関わらず、グルタミン酸要求性を示さなかった。グルタミン酸とグルタミンの両方を除く培地では生育が認められなかったことから、グルタミン酸はグルタミンから生合成されていると予想された。グルタミン酸よりグルタミンを生成するグルタミン合成酵素 (EC 6.3.1.2) のオルソログ LAF1275 が存在することから、その逆反応でグルタミン酸が供給されている可能性が考えられたが、これまでにそのような報告例は存在しない。或いは、これまでには知られていないタイプの新規酵素がグルタミンからグルタミン酸の反応を担っているのかもしれない。しかしながら、他の反応 (*carA+carB*、*pyrG*、*aspC* オルソログ) に付随する形でグルタミンからグルタミン酸が生成され、それだけで生育に十分なグルタミン酸が確保できている可能性も否めない。

セリンとシステインについても、生育評価の結果とゲノムデータベースの情報の矛盾を見出した。セリンは主に3-phospho-D-glycerateから3-phospho-D-glycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95, *serA*)、phosphoserine aminotransferase (EC 2.6.1.52, *serC*)、phosphoserine phosphatase (EC 3.1.3.3, *serB*)を経由して生合成される。セリンは、serine *O*-acetyltransferase (EC 2.3.1.30, *cysE*) を介し*O*-acetyl-L-serineへと変換され、続いてCysMとCysKのヘテロダイマーによりシステインが生成する。BLAST解析では、*L. fermentum*には*serB*及び*cysE*のオルソログは存在しない結果となった (Table 1-7に示すLAF0855はリジン生合成に関わる可能性が高い) が、セリン或いはシステインを除いた培地でも生育が認められた。このことは、それらのアミノ酸が異なる経路で生合成されている可能性を示唆する。セリンに関しては、一つの可能性としてglycine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1, *glyA*, LAF0430)により供給されることが考えられた。しかし、その酵素の生理学的な反応方向は、セリンを切断してグリシンを生成する方向と考え

られ、更に*L. fermentum*はセリンとグリシンを除いた培地でも生育が認められたため、LAF0430はセリンの生合成とは関連がない（或いは小さい）と考えられた。また、*cysE*オルソログは存在しないものの、セリンとシステインの相互変換が、セリン或いはシステイン非要求性に関与している可能性が考えられた。*L. fermentum*は、セリンとシステインをいずれも含まない培地では生育は認められなかったが、その状況下で*O*-acetyl-L-serineを加えると生育は回復した。このことから、未同定のアセチル化或いは脱アセチル化反応により、セリンからシステイン、或いはシステインからセリンの反応が進んでいることが示唆された。*serA/B/C*経路に関しては、セリン及びシステインを含まない培地に、*serB*の基質である3-phosphoserineを加えることで生育が認められたため、*serA/B/C*経路は機能していることが伺えた。

セリンとシステインの生合成についてまとめると、セリンはおそらく3-phospho-D-glycerateを介して生合成されるが、*serB*のオルソログは存在しないため、何らかの別のphosphataseが*serB*と同じ役割を担っていると予想される。この点に関しては、独立栄養性水素細菌として知られる*Hydrogenobacter thermophilus*において、phosphoglycerate mutaseとアノテーションされていた酵素（HTH0103及びHTH0183）が3-phosphoserineを基質にセリンを生成することが報告されており（Chiba *et al.*, 2012）、*L. fermentum*でもそれらのオルソログであるLAF0767がセリン生合成に寄与しているのかもしれない。システインはセリンから*O*-acetyl-L-serineを介して、おそらくLAF0855（1-2-3に記したように更なる検証が必要）或いはLAF0642（*L. plantarum* WCFS1株の*cysE*オルソログ（*lp\_0254*）のホモログにあたるが、相同性は低い（2e-02）により生成すると考えられる。セリンとシステインをいずれも含まない培地で生育しないことに対して明確な説明はできないが、*cysE/cysM/cysK*オルソログや未同定の酵素によるアセチル化、脱アセチル化によるセリンとシステインの相互変換が、それらのいずれかを含む培地では生育するという表現型の理由の一端を担っている可能性は十分に考えられる。しかしながら上記の考察から、セリン、システインに関しては、これまでとは全く異なるような新規経路が存在する可能性は低く、既存経路に依存していることが強く伺える結果であった。

以上のことから、*L. fermentum*において新規経路が期待されたグルタミン酸及びセリン、システインについては新規経路が存在する可能性はないとは言い切れないまでも、その可能性は低いと考え、更なる解析には踏み込まなかった。

#### (ii) *L. reuteri* JCM 1112

*L. reuteri* JCM 1112は、アミノ酸のSingle-omission解析から、システイン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、アスパラギン、リジン、グルタミン酸、グルタミンに対し非要求性を示すことがわかった。*L. fermentum*と同様、*L. reuteri*もグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（*gdhA*、EC 1.4.1.4）のオルソログも有していなかったため、グルタミン酸とグルタミンは、グルタミンナーゼ（EC 3.5.1.2、*LAR0237*）或いはグルタミン合成酵素（EC 6.3.1.2、*LARI135*）よりそれぞれ産生されると考えられる。*L. reuteri*はまた、3-phospho-D-glycerateからセリンを生合成するのに必要なオルソログを全て欠いていたが、グリシン、或いはシステインに対し非要求性であり、それらはセリンから生合成されていたと考えられる。グリシンについては、その生



成に関わるThr aldorase (EC 4.1.2.5) のオルソログを有していないため、*glyA*オルソログである*LAR0445*によってのみ生成すると予想される。システインについては、*L. fermentum*と同様に*cysE*の典型的なオルソログは存在しないものの、*cysE/cysM(LAR1677)/cysK(LAR1459)*オルソログにより生合成されると推察された。他のアミノ酸についても、非要求性を示した結果とゲノム情報は一致したため、*L. reuteri*においてもアミノ酸に関して新規経路が存在する可能性が低いと考え、更なる追求は行わなかった。

(iii) *L. gasseri* ATCC 33323

Single-omission解析の結果、殆どのアミノ酸に対し要求性を示し、非要求性を示したのはアラニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミンのみであった。アラニンに関してはglutamate-pyruvate aminotransferase (EC 2.6.1.2、*LGAS1128*) によりピルビン酸からアラニンが産生され、グルタミン酸・グルタミンに関しては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (*gdhA*、EC 1.4.1.4) のオルソログは存在しないものの、グルタミナーゼ (EC 3.5.1.2、*LGAS0507*) 或いはグルタミン合成酵素 (EC 6.3.1.2、*LGAS1379*) よりグルタミン酸とグルタミンがそれぞれ産生されると考えられた。アスパラギン酸・アスパラギンに関しては、オキサロ酢酸からaspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1、*LGAS1128*) によりアスパラギン酸が、更にasparagine synthetase (EC 6.3.1.1、*LGAS1786/LGAS0135*) によりアスパラギンが生合成されると予想された。しかし、アスパラギン酸とアスパラギンの両方を培地から除くと生育が認められなかったため、アスパラギン酸のみを含まない培地で生育したのはasparaginase (EC 3.5.1.1、*LGAS0851/LGAS1433*) によりアスパラギンからアスパラギン酸が供給されていたためであること、また*LGAS1128*はaspartate aminotransferaseとして機能していない可能性があることが考えられた。以上のように、*L. gasseri*のアミノ酸に関しては新規経路が存在する可能性を伺うことはできなかった。

(iv) *L. brevis* ATCC 367

Single-omission解析の結果、*L. gasseri*とほぼ同様に、アラニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミンに対し非要求性を示した。アラニンに関しては、Table 1-8に示すglutamate-pyruvate aminotransferase (EC 2.6.1.2) の幾つかのオルソログ (候補) のうちのいずれかがピルビン酸からアラニンを生成する活性を有していると考えられた。グルタミンに関しては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.4.1.4、*gdhA*) のオルソログは存在しないものの、グルタミン合成酵素 (EC 6.3.1.2、*LVIS0990*) よりグルタミン酸からグルタミンが生成すると予想された (グルタミン酸に関しては要求性であったが、これはグルタミナーゼ (EC 3.5.1.2) のオルソログを有していないことと一致する)。アスパラギン酸・アスパラギンに関しては、*L. gasseri*の場合と同様の傾向が認められた。オキサロ酢酸からaspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1、*LVIS0855*) によりアスパラギン酸が、更にasparagine synthetase (EC 6.3.1.1、*LVIS1649/LVIS1501*) によりアスパラギンが生合成されると予想されたが、アスパラギン酸とアスパラギンの両方を培地から除くと生育は認められなかった。アスパラギン酸のみを含まない培地で生育したのはasparaginase (EC 3.5.1.1、*LVIS1836*) によりアスパラギンからアスパ

ラギン酸が供給されていたためであること、またLVIS0855はaspartate aminotransferaseとして機能していない可能性があることが考えられた。このように、*L. brevis*のアミノ酸についても新規経路の可能性を伺うことはできなかった。

## II. 核酸系物質

### (i) *L. fermentum* IFO 3956

*L. fermentum* は、プリン、ピリミジン系の核酸系物質を全く含まない培地においても生育が認められた（但し、十分な生育を示すには、通常 48 時間程度であるのに対し 96 時間と長時間を要した）。それぞれの生合成に関わる生合成をほぼ全て備えているため、妥当な結果であると考えられたが、唯一、XMP より GMP を生成する GMP synthetase をコードする *guaA* のオルソログをゲノムデータベース上に見出すことができなかった。Xanthosine から Guanosine、或いは Xhathine から Guanine を生成するような酵素が存在する報告例はなく、XMP から GMP を生成する酵素も含め、何らかのこれまでに知られていないタイプの酵素が、それらの（いずれかの）反応を担っている可能性が考えられる。また、別の新しい経路で GMP が生成している可能性も考えられる。今後、*E. coli* の *guaA* 欠損株を利用して、*L. fermentum* のゲノムライブラリーを導入することで、上記の謎を解く鍵遺伝子を見つけることができるかもしれない。

### (ii) *L. reuteri* JCM 1112

生育評価の結果、ピリミジン系物質については要求性を示さず、一方でゲノムデータベースには *de novo* 合成に関与するオルソログのセットが備わっているため、新規経路の可能性はないと考えられた。また、プリン系物質に対しては、次項に述べるように、ゲノムデータベース上には各プリン系物質の *de novo* 合成に関与する一連のオルソログが存在するのにも関わらず、培地に IMP（または salvage 経路で代謝可能なプリン系物質）が必要であった。しかしながら、逆を言えば IMP さえ添加すれば生育が可能ということであり、このことからプリン系物質に関しても新規経路の可能性を伺うことはできなかった。

### (iii) *L. gasseri* ATCC 33323

*L. gasseri* においては、プリン系物質に関しては生育評価の結果とゲノム情報とは一致したが、ピリミジン系物質に関して、nucleoside diphosphate kinase をコードする *ndk* オルソログが存在しないにも関わらず、生育にはその後流の Thymidine、deoxyuridine、deoxycytidine、dTMP、dUMP のいずれかを必要とした。

*ndk* オルソログを有していないため、UTP、CTP、dTTP を生成できないと考えられたが、実際は *ndk* オルソログには当たらない、異なるタイプのキナーゼがそれぞれ UDP、CDP、dTDP を基質にピリミジン系物質を生成する役割を担っていると予想される。

dUMP を添加した際は *thyA* オルソログ (*LGAS0830*) により、また thymidine や deoxyuridine を添加した際は *tdk* のオルソログである (*LGAS1249*) により dTMP が供給され、生育が可能になると考えられる。一方で deoxycytidine を添加した際は、deoxycytidine を deoxyuridine へ変換する *cdd* オルソログが存在しないのにも関わらず生育が認められた。この理由としては

deoxycytidylate deaminase をコードする *LGAS0202*、或いは cytosine を uracil へ変換する *codA* のオルソログ *LGAS0367* が *cdd* と同様の機能を果たしていると考えられた。

以上のように、新規経路が存在する可能性も排除できないが、ここで述べた候補酵素の *in vitro* での解析を通して、その可能性の有無を明確に判断することができると考えられる。

#### (iv) *L. brevis* ATCC 367

*L. brevis* に関しては、プリン系については IMP の添加、ピリミジン系についてはオロチン酸の添加が生育に必要であり、ゲノムデータベース上も IMP、或いはオロチン酸までの生合成遺伝子を欠いていた。また IMP やオロチン酸以降の経路に関してはオルソログがほぼ全て存在していた。このため、新規経路が存在する可能性をない（少ない）と判断し、検討を終了した。

### III. ビタミン

#### (i) *L. fermentum* IFO 3956

6つのビタミンを対象に生育評価を行った結果、リボフラビン、葉酸、ビタミン B6 について非要求性を示した。リボフラビンに関しては、*E. coli* における関連遺伝子のオルソログをほぼ全て備えているため、既知経路で生合成されていると考えられた。一方で葉酸については、dihydropteroate synthase (EC 2.5.1.15、*folP*)の片方の基質にあたる *p*-アミノ安息香酸 (PABA) までの3遺伝子：*pabABC*のオルソログが存在しないのにも関わらず、葉酸や PABA 非要求性を示した。葉酸（或いは PABA）に関しては、その新規経路の探索を目的に更に踏み込んで解析を行った結果について次章に記述した。ビタミン B6 については、培地中に全てのアミノ酸を加えた中で評価した結果であるため、ビタミン B6 がそもそも生育に不要であったのか、それともビタミン B6 が別の新規経路で生合成されているのかは明らかとなっていない。明確にするためには、全てのアミノ酸の *de novo* 合成が可能な菌株（ヘテロ組換え株）で生育評価を行う必要があるが、*L. fermentum* の場合、組換え系の整備が進んでいないため解析は困難であった。このため、本研究においては更なる解析を行わなかったが、ビタミン B6 の新規生合成経路の有無を判断するにはクリアしなければならない課題と考えられる。

#### (ii) *L. reuteri* JCM 1112

生育評価の結果、リボフラビン、葉酸について非要求性を示した。リボフラビンに関しては、*L. fermentum* と同様の考察が考えられた。また葉酸に関しても *L. fermentum* と同様に *p*-アミノ安息香酸 (PABA) までの3遺伝子：*pabABC*のオルソログが存在しないのにも関わらず、葉酸や PABA 非要求性となったが、その新規経路の可能性の追求については、*L. fermentum* に絞って解析した (*L. fermentum* でわかった知見を元に *L. reuteri* でも解析行う予定とした) ため、本研究においては *L. reuteri* の葉酸、PABA の生合成経路に関して、更なる知見を得ることはできなかった。

#### (iii) *L. gasseri* ATCC 33323

チアミン、リボフラビン、葉酸を除いた培地において、十分とは言えないまでも生育が認められた。ゲノムデータベースには、それぞれの生合成に関わるオルソログのセットが備わ

っていないため、それらが新規経路で生合成されている可能性が考えられる。しかしながら生育評価においては、それらのうち1つがなくとも、他のアミノ酸、核酸系物質、ビタミンにより代謝経路が動く可能性も十分考えられるため、ゲノム情報が示す通り、チアミン、リボフラビン、葉酸は生合成されていない可能性も高い。まずは、菌体内にそれらのビタミン、或いは中間体が含まれているかどうか、集菌した（大量の）菌体より取得した破碎液を対象に直接的に検証する必要があると考えられる。

#### (iv) *L. brevis* ATCC 367

*L. brevis* に関しては、生合成遺伝子を備えているリボフラビンについてのみ非要求を示し、その他のビタミンについてはゲノム情報通り要求性を示した。このため、ビタミンに関して新規経路の可能性を見出すことはできなかった。

### 1-3-2. 生合成遺伝子の存在と相反した「要求性」

生合成遺伝子が存在するのにも関わらず、要求性を示す現象が幾つか認められた。

- ① *L. fermentum* : スレオニン (homoserine 添加で非生育、*LAF1146* や *LAF1144* が偽?)
- ② *L. fermentum* : メチオニン (homocysteine 添加で非生育、*LAF0828* が偽?)
- ③ *L. reuteri* : メチオニン (homocysteine 添加で非生育、*LAR0993* が偽?)
- ④ *L. gasseri* : グリシン (*LGAS0256* が偽?)
- ⑤ *L. brevis* : グリシン (*LVIS1287* が偽?)
- ⑥ *L. reuteri* : IMP (PRPP~IMP に関わるいずれかの遺伝子が偽?)
- ⑦ *L. gasseri* : dUMP (*LGAS0138*, *LGAS1503*, *LGAS1705* が偽?)

1-2 でも記した通り、いずれの場合もゲノムデータベース上のいずれかのオルソログが機能を失った偽遺伝子である、或いは別の機能を持つ遺伝子であることが推察される。

①については、他のアミノ酸（リジンやメチオニン）の影響で見かけ上、スレオニン要求性となってしまった可能性もある。②及び③については、実際は homocysteine の安定性や細胞内の取り込みの問題も考えられ、他に原因があることも十分考えられる。④、⑤に関しては、培地に葉酸が添加されている系にも関わらずグリシン要求性を示したこと、スレオニンからの経路を有していないことから、上記オルソログが機能していない可能性が高いと考えられるが、該当オルソログの相同性は十分に高いことから、実際はそれらが何らかの形（転写レベル、或いはタンパク質レベル）で阻害を受けているのかもしれない。また、活性に必要な葉酸に着目すると、Table 1-23 に示すように *L. fermentum* や *L. reuteri* とは違い *L. gasseri* と *L. brevis* は明らかに葉酸を生合成することは不可能だと考えられ、*L. gasseri* と *L. brevis* の評価において培地中に添加した葉酸が効いていなかった（添加方法が悪いのか、それとも添加量が不足したのか）可能性も考えられる。但し、少なくとも *L. gasseri* の場合は葉酸を加えた場合とそうでない場合で生育に差が見られたため、その可能性は少ないかもしれない。⑥に関しては、*L. reuteri* と *L. fermentum* を比べてもオルソログの存在や相同性に殆ど差は見られないため、本当に IMP までの経路に偽遺伝子や別機能を持つ遺伝子が存在するのかは疑問で

ある。なお、PRPP 生合成までの一連のオルソログも存在するが、それまでの経路のいずれかが機能を果たせていない可能性も考えられる。⑦に関しても、核酸代謝経路が複雑な故に、ここで上げたオルソログが原因なのかどうかは明白ではない。

このように、それ程数は多くなかったにせよ、新規生合成経路を期待させる結果（非要求性だがオルソログは備わっていない）とは逆の結果（オルソログが備わっているのに要求性）が見つかった。これらを解析（例えば候補遺伝子の *in vitro* 解析）することで、上記の矛盾点をクリアにすることができ、更には（乳酸菌の）一次代謝経路について新たな知見を得ることができるかもしれない。

### 1-3-3. 乳酸菌ゲノムサイズと栄養要求性

本研究において、*L. delbruckii* を除く乳酸菌 4 株のアミノ酸、核酸系物質、ビタミン要求性について網羅的に評価を行った。要求性の結果はそれぞれ Table 1-12、Table 1-17、Table 1-24 にまとめたが、予想通り数多くの物質に対し要求性が示された。一方でゲノム情報を見ると、例えばアミノ酸においては、ヒスチジンや芳香族アミノ酸を除けば、生合成遺伝子のセットを全く有していないというわけではなく、その中の一部を欠いているため要求性を示すパターンが多いように見受けられた。核酸系物質やビタミンについても同様の傾向が認められ、このことが、乳酸菌のゲノムサイズが比較的大きい割に、数多くの栄養要求性を示すという特徴の理由の 1 つとして考えられる。また、ゲノム情報を精査する中で、ある物質の生合成に重複した経路があるパターンは少なかった（例えばあるアミノ酸の *de novo* 合成に関して、大腸菌等では複数経路知られているが、乳酸菌ではそのうちの 1 つしか有していないが多かった）が、aminotransferase や dehydrogenase 等、オルソログとして必ずしも 1 対 1 で割り当てられない、同種類の酵素を複数有しているケースも散見された。そのような酵素は、おそらくは広い基質特異性を有し、ある程度様々な代謝反応に対応でき、外界の物質への依存度が高い乳酸菌の生育に一役買っているものと考えられる。また、ゲノム情報の特徴として、*L. fermentum* や *L. reuteri* は、*L. gasseri* や *L. brevis* と比べ比較的多くの生合成遺伝子を備えていた。更に、*L. reuteri* より *L. fermentum* の方が一次代謝系の遺伝子数が多く、本研究で生育評価に用いた MRS 培地や LSP 培地で *L. fermentum* の生育が最も旺盛であったことと関連していると考えられた。

本研究において、*L. delbruckii* についても評価を試みたが生育不良を示したため検討を中止せざるを得なかった。原因は不明であるが、凍結乾燥菌を最初に MRS 培地で生育させた時点で著しい生育不良を示し、乳酸菌の扱いに不慣れであったことが災いしたのかもしれない。*L. delbruckii* の解析により更に別の知見を得られた可能性もあるが、評価を行った 4 株の傾向から考えると、当初期待していた以上は乳酸菌が新規経路を有する可能性は低いのもかもしれない。しかしながら PABA に代表されるように、有望な新規経路の可能性も一部見出すことができた。今後、更なる解析を通して、今回示唆された可能性を少しでもクリアにすることで、新たな知見が得られることを期待したい。

## 第2章 新規葉酸生合成経路の解析

### 2-1. 序

第1章にて記述したように、新規一次代謝経路の探索を行った結果、*L. fermentum* 及び *L. reuteri* において、コリスミ酸から *p*-アミノ安息香酸 (PABA) までの経路が存在しないにも関わらず、葉酸非要求性を示し、このことから葉酸 (或いは PABA) の新規生合成経路が存在する可能性を見出した。いずれの株も PABA 生合成経路以外の葉酸生合成経路遺伝子は全て備わっていたため、PABA が何らかの形で供給され生育可能になっている、つまりは PABA がこれまでに知られていない経路で生合成されている可能性が考えられた。生育に葉酸を必要としないことも考えられたが、Table 1-29 に示すように葉酸を必要とするオルソログが多数存在するという事実は、やはり *L. fermentum* や *L. reuteri* において葉酸が生合成されていることを示唆するものである。もし、*L. fermentum* や *L. reuteri* において葉酸生合成経路の一部 (遺伝子) を破壊することで、例えば生育不良等の表現型が示されれば、葉酸が生体内で作られている証拠の一つを提示できたのかもしれないが、各株の遺伝子組換え系を持ち得ていなかったため検証することはできなかった。

葉酸は、pterin 部分、PABA 部分、( $\gamma$  結合を通した) グルタミン酸部分から構成される化合物である。Table 1-29 にも示した通り、主に、メチオニン、グリシン、パントテン酸、プリン (IMP)、チミジル酸 (dTMP) 等の生合成に関与する。PABA は一般にコリスミ酸より生合成される。コリスミ酸自身は、芳香族化合物やユビキノン、メナキノン等の前駆体としても産生される重要な中間体である。

*E. coli* における PABA 生合成に関する研究は古くから行われており、PABA 要求性を示す変異株の解析を通した *pabA* 及び *pabB* 遺伝子の単離からその歴史は始まっている (Huang *et al.*, 1967; Huang *et al.*, 1970)。後に、PabA と PabB は中間体である 4-amino-4-doxychorismate を生成すること (Nichols *et al.*, 1989; Ye *et al.*, 1990)、PabC が PLP 依存的に 4-amino-4-doxychorismate から PABA を生成すること (Anderson *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1992; Jhee *et al.*, 2000; Parsons *et al.*, 2002) が明らかとなった。PabA と PabB は 1:1 のヘテロダイマーを形成し、コリスミ酸とグルタミンを 4-amino-4-doxychorismate へと変換する。PabA は glutaminase として機能するが、PabB と結合した時のみ活性を示す。PabB は aminodeoxychorismate synthase として機能し、PabA によりグルタミンから加水分解したアンモニア分子をコリスミ酸へ結合する役割を果たす。PabC は lyase であり、4-amino-4-deoxychorismate の切断と aromatization を通して PABA とピルビン酸を生成する (Roux *et al.*, 1992)。なお、PabB は PabA が存在しなくとも、フリーのアンモニアを利用して (効率は悪いものの) コリスミ酸をアミノ化し 4-amino-4-deoxychorismate を生成することが可能であることが知られている。また、PabA、PabB、PabC の3者が複合体を形成している可能性も示唆されている (Roux *et al.*, 1992) が、これまでに

そのような複合体を単離できた報告例は存在しない。PabA と PabB から成る 4-Amino-4-deoxychorismate synthase のようにコリスミ酸を利用する酵素は、*E. coli* においては他にも EntC、UbiC、TyrA、PheA、TrpDE が存在する。PabB は、TrpE とアミノ酸配列相同性が 26%、塩基配列相同性は 40%を示すことから、共通の祖先から進化した酵素であると考えられている (Goncharoff *et al.*, 1984)。一方、*E. coli* において *pabB* 破壊株或いは *pabA* 破壊株は glucose を炭素源とした最少培地で生育できないが、これらの株に対し *trpE* 等ではなく、*menF* を過剰発現すると生育可能となることが報告されている (Patrick *et al.*, 2007)。MenF はコリスミ酸を基質に isochorismate を生成する酵素であるが、その過程では PabB の担う反応と同じ中間体を生成すると考えられ、*menF* の過剰発現により少量なりとも蓄積したその中間体にアンモニアが結合し 4-amino-4-deoxychorismate が生成することで相補されたと推察されている。

また、*T. thermophilus* HB8 株においては、TTHA0620 が *pabA* と *pabB* 両者のオルソログに当たり、単独の酵素が glutaminase 活性と aminodeoxychorismate synthase 活性と有していると予想されている。また、染色体上の並びにあたる TTHA0621 が 4-amino-4-deoxychorismate lyase 活性を有する *pabC* オルソログであると考えられている (Padmanabhan *et al.*, 2009)。

一方、メタン生成古細菌として知られる *Methanococcus maripaludis* や *Methanococcus jannaschii* においては、PABA がコリスミ酸を経由しない別経路で生合成されることが示唆されている (Porat *et al.*, 2004; Porat *et al.*, 2006)。methylglyoxal と fructose-1,6-bisphosphate より生成される 6-deoxy-5-ketofructose 1-phosphate (DKFP) と L-aspartate semialdehyde を出発に DKFP synthase (EC 2.2.1.11)、fructose-1,6-bisphosphate aldolase (EC 2.2.1.10、*aroA'*)、dehydroquinate synthase II (EC 1.4.1.24、*aroB'*) により 3-dehydroquinate (DHQ) が生成する経路 (DKFP 経路) は、その後流のシキミ酸、コリスミ酸、芳香族アミノ酸生合成のための重要なステップとされ、PABA は DHQ から生合成されることが考えられている (White *et al.*, 2004; White *et al.*, 2006; Morar *et al.*, 2007; Samland *et al.*, 2008)。DHQ より PABA に至る経路に関しては、その反応機構は推定されているものの (Porat *et al.*, 2006)、反応に関わる酵素や遺伝子については今までのところ明らかにされていない。

*L. fermentum* や *L. reuteri* において PABA が DHQ より生合成される可能性も考えられたが、*E. coli* と同様の経路を辿ると仮定した場合の *aroF*、*aroH*、*aroG*、*aroB* の各オルソログが存在しないこと、一方で *aroA'* や *aroB'* のオルソログを持たないことから DKFP 経路を有していないことが予想されたため、その可能性は低いと考えられた。

*L. fermentum* や *L. reuteri* にて PABA の新規生合成経路の可能性が期待されたが、そもそも dihydropteroate synthase (*folP*、EC 2.5.1.15) のオルソログに当たる LAF1336 或いは LAR1208 が PABA ではない化合物を基質とする可能性も考えられた。そこで、本研究においては、菌株を *L. fermentum* に絞り、まずは LAF1336 が PABA を基質とするかどうかを確かめるため、*E. coli* を利用した相補試験、及び *in vitro* の解析を行うことにした。*L. fermentum* において LAF1336 破壊株を作製し、*E. coli* の *folP* が相補可能かどうかの検討も行う方法も考えられたが、遺伝子組換え系を有していなかったために検証できなかったことを追記する。

## 2-2. 結果

### 2-2-1. *E. coli pabABC* 欠損株を利用した相補試験

最初に、*E. coli* BW25113 株より *folP* 遺伝子を破壊した株を作製した。破壊に際しては、Fig. 2-1 に示すように、 $\lambda$ -Red システムを利用した相同組換えを利用した。取得した *folP* 破壊株は LB 培地において生育不良を示したが、葉酸を補填することにより生育の回復が認められた (Fig. 2-1(A))。続いて、*LAF1336* 及び *folP* を発現するプラスミド：[pUC118 : *LAF1336*]及び [pUC118 : *folP*] (いずれも上流 300 bp をプロモータとして含む ORF を pUC118 ヘクローニングして作製) を導入した結果、*folP* 並びに *LAF1336* の導入により生育が完全に回復することが示された (Fig. 2-1)。このことから *LAF1336* が *E. coli* 細胞内で *folP* の代わりに 7,8-dihydropteroate synthase として機能をすることを確認することができた。このことは、同時に *LAF1336* が PABA を基質とすることで葉酸合成に関与していることを示唆するものであった。

次に *folP* 破壊株より更に *pabABC* を破壊した株を造成した。その株に *LAF1336* 及び *folP* を発現するプラスミドを導入し、最少培地で生育させた結果を Table 2-1 に示した。

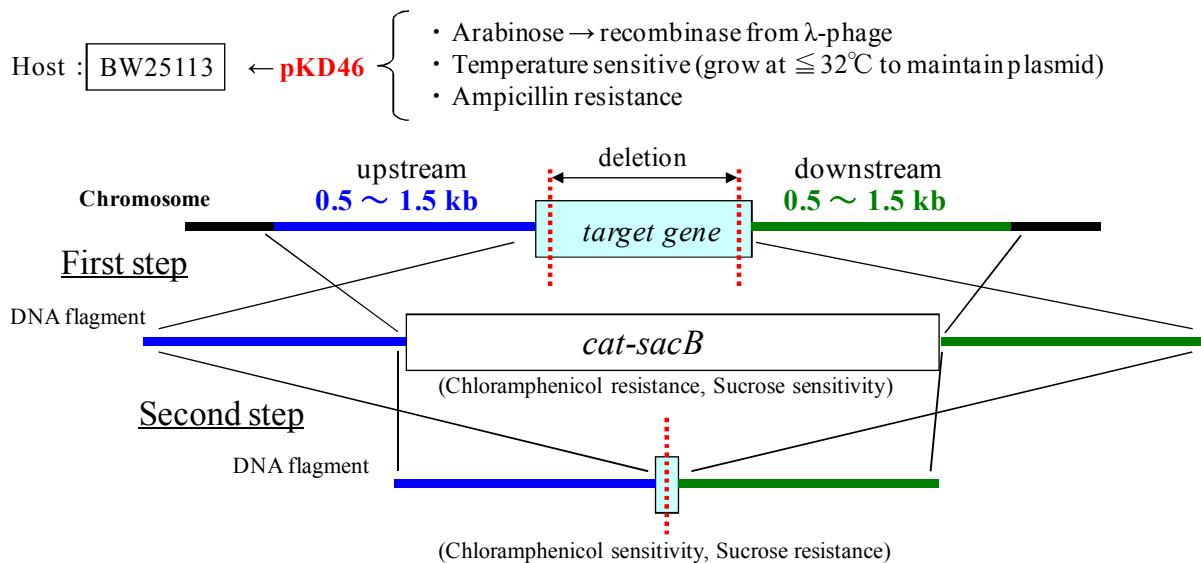
**Table 2-1 Growth of the  $\Delta folP/\Delta pabABC$  mutant and its transformant harboring *E. coli folP* gene or *L. fermentum LAF1336* gene.**

Strain	- PABA	+PABA
WT [pUC118 : <i>folP</i> ]	0.34	0.33
WT [pUC118 : <i>LAF1336</i> ]	0.35	0.35
$\Delta folP$ [pUC118 : <i>folP</i> ]	0.32	0.29
$\Delta folP$ [pUC118 : <i>LAF1336</i> ]	0.33	0.33
$\Delta folP, \Delta pabA, \Delta pabB, \Delta pabC$ [pUC118 : <i>folP</i> ]	0.00	0.50
$\Delta folP, \Delta pabA, \Delta pabB, \Delta pabC$ [pUC118 : <i>LAF1336</i> ]	0.00	0.87

Growth of wild type (WT),  $\Delta folP$  mutant, and  $\Delta pabA, \Delta pabB, \Delta pabC, \Delta folP$  mutant harboring pUC118 carrying *E. coli folP* gene or pUC118 carrying *LAF1336* gene in M9 medium containing 0.1% glucose and ampicillin (0.1 mg/mL) for 60 hours at 30 °C was measured at OD600.

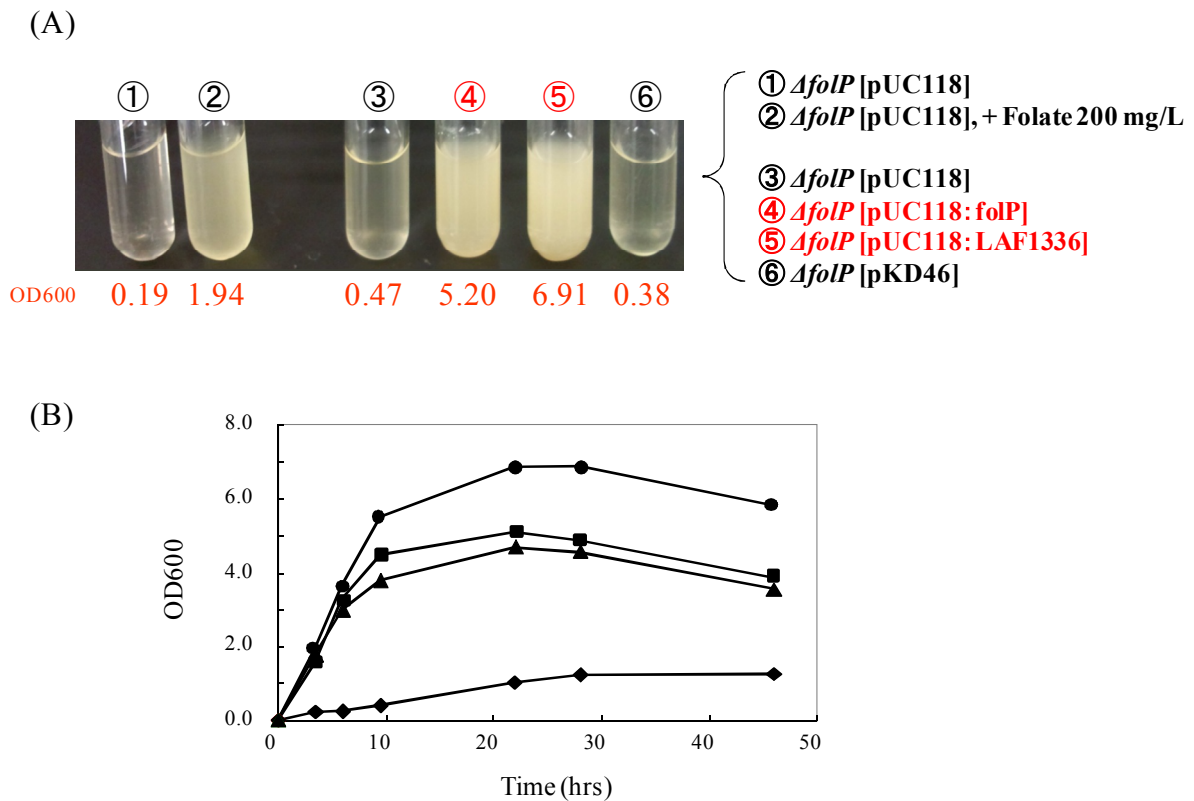
結果、*folP, pabA, pabB, pabC* の 4 重破壊株に対し *LAF1336* を発現させたは、*folP* を発現させた株と同様に、培地中に PABA が存在しない場合は全く生育しなかった。もし *LAF1336* が PABA ではない別の化合物を基質とするならば、PABA を含まない培地でも生育する可能性が考えられたが、このように実際は生育不能であることが確認され、このことから *LAF1336* が PABA を基質とすることが強く示唆された。





**Fig. 2-1 The method for homologous recombination in *E. coli***

In the first step, a DNA fragment containing a chloramphenicol resistance (*cat*) and *sacB* gene encoding a sucrose from *Bacillus subtilis* was amplified. The upstream region and downstream region of target genes were amplified and then the *cat-sacB* cassette was constructed by fusion PCR. The cassette were introduced into *E. coli* BW25113 harboring the pKD46 plasmid. After induction of recombinant enzymes with arabinose, chloramphenicol resistant and sucrose sensitive colonies, in which the targeted gene was replaced with the *cat-sacB* cassette, were selected. In the second step, a DNA fragment, in which the target genes were deleted in-frame were amplified by fusion PCR. The fragment was introduced into the strain constructed by the first step to replace the *cat-sacB* cassette. Then, chloramphenicol sensitive and sucrose resistant colonies were selected and gene-disruptions were confirmed by PCR.



**Fig. 2-2 Growth of the  $\Delta folP$  mutant and its transformants harboring  $folP$  gene or  $LAF1336$  gene.**

(A) The  $\Delta folP$  mutant and its derivatives were grown in LB liquid medium containing ampicillin for 57 hours at 37°C. (B) Growth of the  $\Delta folP$  mutant harboring pUC118 (diamond), wild type strain harboring pUC118 in the presence of folic acid (triangle),  $\Delta folP$  mutant harboring pUC118 carrying the  $folP$  gene cloned from *E. coli* (square), and  $\Delta folP$  mutant harboring pUC118 carrying the  $folP$  gene cloned from *L. fermentum* IFO 3956 ( $LAF1336$ ) (circle) in LB medium containing ampicillin at 37°C was measured.

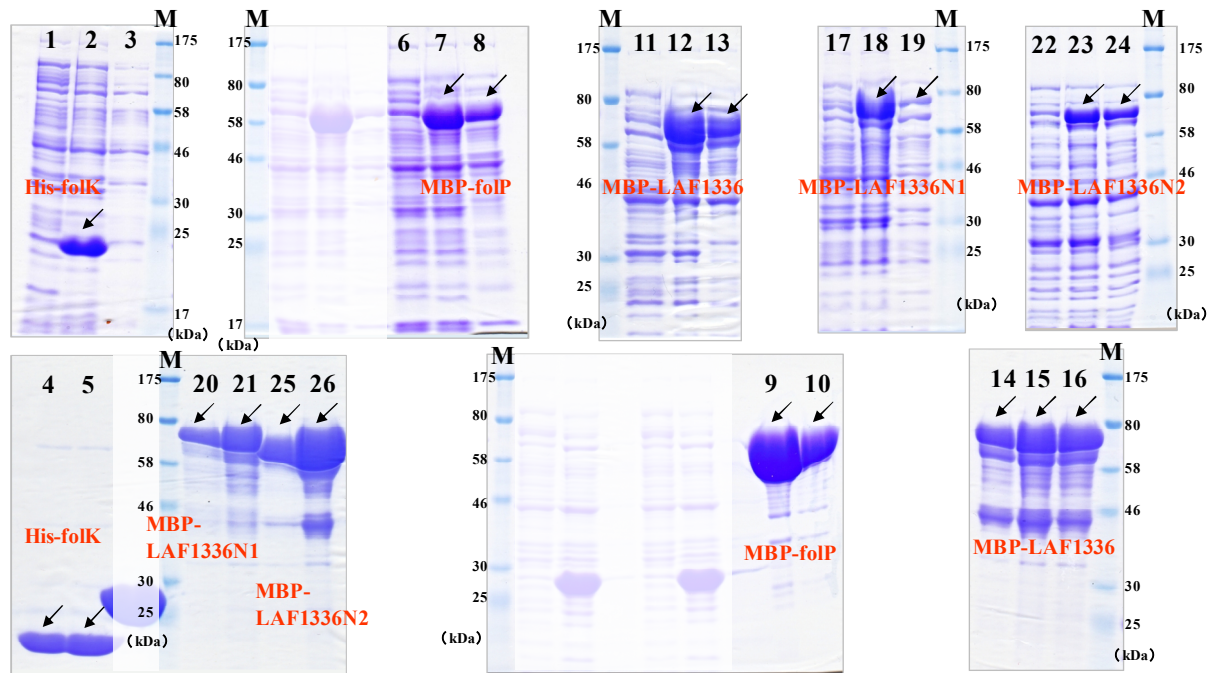
## 2-2-2. LAF1336 発現検討

続いて、LAF1336がPABAを基質とするかどうかを確かめるため、*in vitro*での検証を行った。LAF1336の基質の一つと予想される6-hydroxymethyl-dihydropterin diphosphateは、試薬としてのメーカーからの販売がなく入手困難であったが、前段のFolK (2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine pyrophosphokinase、EC 2.7.6.3) の基質の一つ6-hydroxymethyl-dihydropterinは入手可能であったため、FolKとLAF1336を利用した連続反応による検証を試みた。酵素反応にあたり、FolPも含めたそれぞれの精製酵素を取得するため、HisタグやMaltose Binding Protein (MBP) タグを利用した融合タンパクを発現するベクターを用いて発現検討を行った。

結果をTable 2-2に示したが、FolKやFolPについてはHisタグ及びMBPタグとの融合タンパクを期待通り可溶画分に認め精製可能であったが、LAF1336はMBPタグとの融合タンパクは可溶画分に認められたものの、Hisタグとの融合タンパクは不溶画分に認められた (Fig. 2-3)。MBP-LAF1336を酵素反応に使用することも考えたが、Hisタグで不溶画分に認められたことを不安視して、LAF1336の塩基配列の見直しを行うことにした (Fig. 2-4)。その結果、LAF1336の開始コドンについて、アノテーションにより決定されていたGTGの他に3か所の候補を見出すことができた。そこで、それぞれのORFをLAF1336N1、LAF1336N2、LAF1336N3として、Hisタグ或いはMBPタグとの融合タンパクを発現するベクターへ連結した。しかしながら、いずれのORFにおいてもHisタグとの融合タンパクは不溶画分に認められ、MBPとの融合タンパクのみ可溶画分に認められたため (Fig. 2-3)、結局のところ、酵素反応にはMBPとの融合タンパクを利用した。この際、MBP-LAF1336N3に関しては発現レベルが低かったため、その他のMBP-LAF1336、MBP-LAF1336N1、MBP-LAF1336N2をそれぞれFolKと共に連続反応に使用することにした。

**Table 2-2 The expression of His-tagged or MBP-fused proteins: FolK, FolP, or LAF1336.**

Target	Expression Vector	Host	Expression
<i>folK</i>	pQE-30(6×His; N-ter.)	M15[pREP4]	Supernatant
	pMAL-c2x (MBP; N-ter.)	TB1	Supernatant
<i>folP</i>	pQE-30(6×His; N-ter.)	M15[pREP4]	Supernatant
	pMAL-c2x (MBP; N-ter.)	TB1	Supernatant
LAF1336	pQE-30(6×His; N-ter.)	M15[pREP4]	Pellet
	pMAL-c2x (MBP; N-ter.)	TB1	Supernatant
	pETDuet-1 (6×His; N-ter.)	BL21(DE3)	Pellet
LAF1336N1	pQE-30(6×His; N-ter.)	M15[pREP4]	Pellet
	pMAL-c2x (MBP; N-ter.)	TB1	Supernatant
LAF1336N2	pQE-30(6×His; N-ter.)	M15[pREP4]	Pellet
	pMAL-c2x (MBP; N-ter.)	TB1	Supernatant
LAF1336N3	pQE-30(6×His; N-ter.)	M15[pREP4]	Pellet
	pMAL-c2x (MBP; N-ter.)	TB1	Supernatant (low level expression)



lane	Sample
M	Prestained Protein Marker, Broad Range (NEB)
1	pQE-30: <i>folK</i> , IPTG 0 mM, crude
2	pQE-30: <i>folK</i> , IPTG 1 mM, crude
3	pQE-30: <i>folK</i> , IPTG 1 mM, supernatant
4	pQE-30: <i>folK</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 1
5	pQE-30: <i>folK</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 2
6	pMAL-c2x: <i>folP</i> , IPTG 0 mM, crude
7	pMAL-c2x: <i>folP</i> , IPTG 1 mM, crude
8	pMAL-c2x: <i>folP</i> , IPTG 1 mM, supernatant
9	pMAL-c2x: <i>folP</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 1
10	pMAL-c2x: <i>folP</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 2
11	pMAL-c2x: <i>LAF1336</i> , IPTG 0 mM, crude
12	pMAL-c2x: <i>LAF1336</i> , IPTG 1 mM, crude
13	pMAL-c2x: <i>LAF1336</i> , IPTG 1 mM, supernatant
14	pMAL-c2x: <i>LAF1336</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 1
15	pMAL-c2x: <i>LAF1336</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 2
16	pMAL-c2x: <i>LAF1336</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 3

lane	Sample
17	pMAL-c2x: <i>LAF1336N1</i> , IPTG 0 mM, crude
18	pMAL-c2x: <i>LAF1336N1</i> , IPTG 1 mM, crude
19	pMAL-c2x: <i>LAF1336N1</i> , IPTG 1 mM, supernatant
20	pMAL-c2x: <i>LAF1336N1</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 1
21	pMAL-c2x: <i>LAF1336N1</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 2
22	pMAL-c2x: <i>LAF1336N2</i> , IPTG 0 mM, crude
23	pMAL-c2x: <i>LAF1336N2</i> , IPTG 1 mM, crude
24	pMAL-c2x: <i>LAF1336N2</i> , IPTG 1 mM, supernatant
25	pMAL-c2x: <i>LAF1336N2</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 1
26	pMAL-c2x: <i>LAF1336N2</i> , IPTG 1 mM, purified fraction 2

**Fig. 2-3 The expression of FolK by pQE-30 and FolP, LAF1336 by pMAL-c2x**

The indicated constructs were transformed individually into M15[pREP4] (for pQE-30) or TB1 (for pMAL-c2x). Cultures were grown in LB plus glucose at 37°C to an OD600 about 0.5. Target protein expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 1 mM. Cultures were continued at 37°C or 30°C and harvested by centrifugation between 4 and 8 hours after induction. Lysates were produced by sonication (crude samples) and centrifuged to obtain supernatant, followed by purification of His-tagged protein by Ni-NTA Agarose resin (QIAGEN) or MBP-tagged protein by Amylose resin (NEB). Approximately molecular weights of FolK, FolP, LAF1336, LAF1336N1, LAF1336N2, 6×His, and MBP are 18.1 kDa, 30.6 kDa, 40.4 kDa, 41.6 kDa, 35.3 kDa, 0.8 kDa, and 42.5 kDa, respectively.

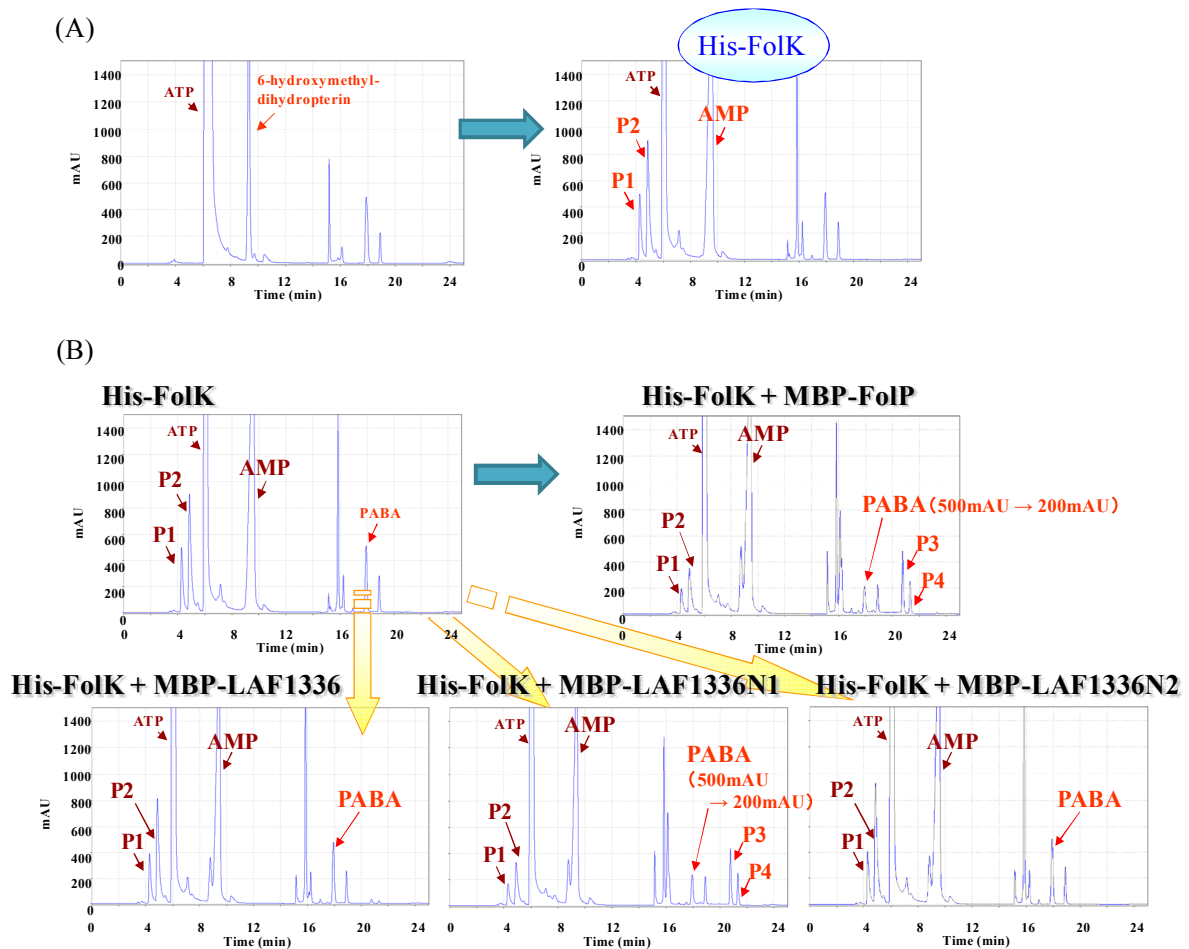


### 2-2-3. LAF1336 の基質及び生成物の同定

前項に記したように、His-FolK、MBP-FolP、MBP-LAF1336、MBP-LAF1336N1、MBP-1336N2 を使用して酵素反応を行った。

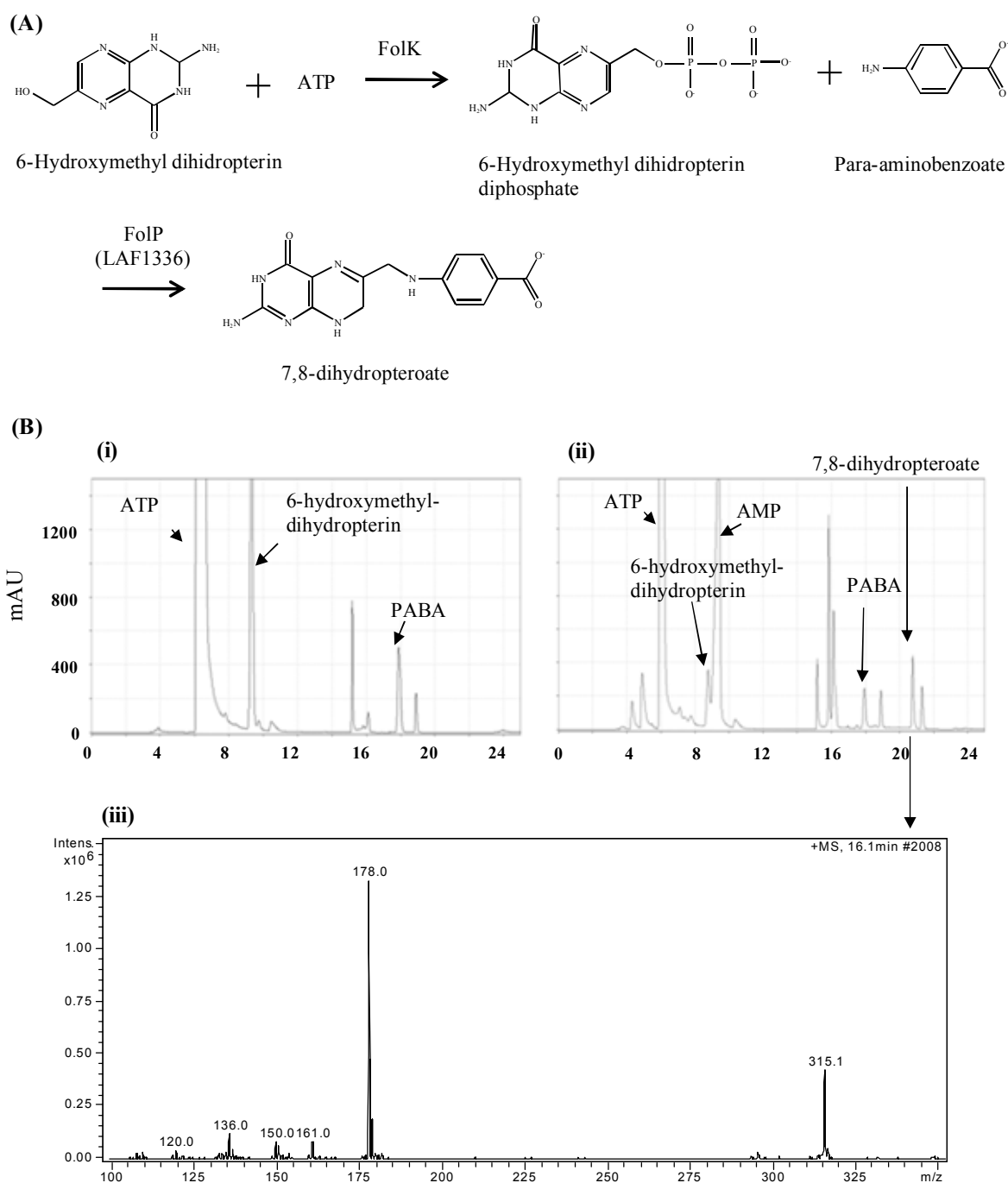
最初に、His-FolK のみで酵素反応を行った結果、ATP のピークの減少、AMP のピークの出現、及び生成物と推定される P1 或いは P2 のピークの出現が認められ (Fig. 2-5(A))、His-FolK が *in vitro* において機能することが示唆された。続いて、His-FolK と MBP-FolP 或いは MBP-LAF1336、MBP-LAF1336N1、MBP-LAF1336N2 の連続反応を行った結果、コントロールである His-FolK+MBP-FolP、及び His-FolK+MBP-LAF1336N1 で PABA ピークの減少、及び生成物と推定される P3、P4 のピークの出現が認められた (Fig. 2-5(B))。MBP-LAF1336 や MBP-1336N2 を使用した際はそれらのピークの動きは認められず、LAF1336 の N 末端の配列がその活性に必要であること、また本来の開始コドンは N1 の位置である可能性が示唆された。P3 及び P4 のピークで表わされる物質を同定するため LC-MS を行った結果、P3 が 7,8-dihydropteroate であることが認められ、LAF1336 が dihydropteroate synthase として機能していることがわかった (Fig. 2-6)。

このように、2-2-1 で示した *in vivo* の結果に加え、*in vitro* においても LAF1336 が PABA を基質とすることが強く示唆された (Kuratsu *et al.*, 2010)。



**Fig. 2-5 HPLC analysis of the products formed from 6-hydroxymethyl-dihydropterin with recombinant FolK, and LAF1336 or FolP**

His-FolK(A) and MBP-FolP or MBP-LAF1336 or MBP-LAF1336N1 or MBP-LAF1336N2(B) were used for an *in vitro* enzyme assay. The reaction mixture (100  $\mu$ l) contained 5 mM 6-hydroxymethyl-dihydropterin, 10 mM ATP, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 1 mM PABA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), and 220  $\mu$ g/mL of the purified His-tagged FolK and 80  $\mu$ g/mL of the purified MBP-fused LAF1336, LAF1336N1, LAF1336N2 or FolP. The HPLC conditions involved a mobile phase where the concentration of acetonitrile in 20 mM potassium phosphate (pH 2.5) was stepwise increased (0–5 min, 0%; 6 min, 8%; 15 min 20%; 16 min, 80%; 17–25 min, 0%) on a Mightisil RP-18 GP column (250  $\times$  4.6 mm) with a flow rate of 1.5 mL/min and detection at 210 nm.



**Fig. 2-6 LC-MS analyses of the products formed from 6-hydroxymethyl- dihydropterin with recombinant FolK and LAF1336 (FolP).**

(A) a schematic of the sequential enzymatic assay with 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl dihydropteridine pyrophosphokinase (FolK) [EC 2.7.6.3] and LAF1336 (FolP). (B) HPLC analysis of the reaction product without enzymes (B-i) and with both enzymes (B-ii). The peak of 7,8-dihydropterate was subjected to LC-MS analysis (B-iii).



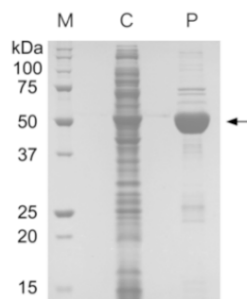
#### 2-2-4. ショットガンクローニング

前項までの結果から、LAF1336 が PABA を基質とすることが強く示唆され、このことから *L. fermentum* において PABA が生合成されている可能性が強く示唆された。*L. fermentum* においては *pabA*、*pabB*、*pabC* オルソログが存在しないが、何らかの遺伝子が PABA の生合成に関与していると考えられる。そこで、*L. fermentum* ゲノム DNA を基にショットガンクローニングにより候補遺伝子の同定を試みた。*Sau3AI* 処理により取得した約 7 kbp の DNA 断片を pUC118 へクローニングし、宿主として用いた *E. coli*  $\Delta$ *pabABC* 株を形質転換した。取得した形質転換体のうち、PABA を含まない M9 プレートで生育するコロニーの取得を試みたが、凡そ 20 万の形質転換体を評価した中で、コロニーを取得することができなかった。*L. fermentum* において候補遺伝子を取得できなかった理由については後述する。

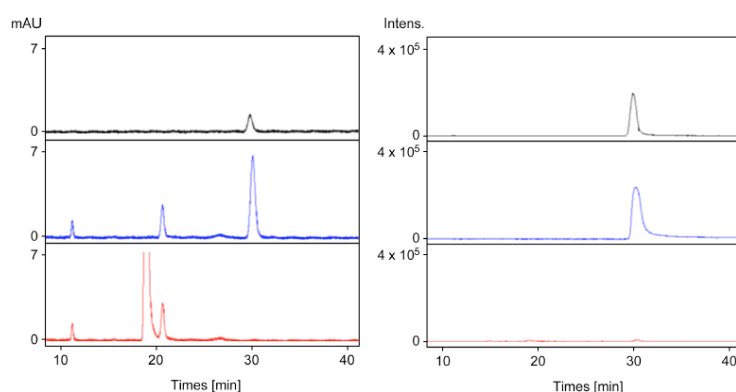
*L. fermentum* と同様、*Nitrosomonas europaea* NBRC14298(ATCC 19718)株もまた、葉酸非要求性にも関わらず、葉酸生合成経路のオルソログのセットを有しているものの、*pabA*、*pabB*、*pabC* オルソログは有していないことが知られていた(GTP cyclohydrolase I, NE1163; dihydroneopterin aldolase, NE0223; 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase, NE0070; dihydropteroate synthase, NE0529; dihydrofolate synthase, NE0696; dihydrofolate reductase, NE0567) (Chain *et al.*, 2003)。PABA 生合成に関しては、唯一 *trpE* としてアノテーションされていた *NE2150* が、PabB を query とした Blast 検索によりヒットした。微生物は一般に *pabB* のオルソログとして、一つは *pabB* を、もう一つはトリプトファン生合成に関わる anthranilate synthase subunit をコードする *trpE* を持つ。*NE2150* が PabB として機能するのか、TrpE として機能するのかを確かめるため、His タグとの融合タンパク質を調製し *in vitro* assay を行った (Fig. 2-7)。その結果、コリスミ酸と  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を基質として用いた際に anthranilate の生成が認められ、*NE2150* は実際に anthranilate synthase をコードすることが示された。このことは同時に、*N. europaea* において PABA が新規経路で生合成されていること示唆するものでもあった。

そこで、*N. europaea* においても *L. fermentum* の場合と同様、ショットガンクローニングにより PABA 生合成遺伝子に関わる遺伝子の取得を試みた。その結果、PABA を含まない M9 プレートで生育するコロニーを多数取得できた。そこで、ランダムに選択した形質転換体よりプラスミドを調製してシーケンス解析を行ったところ、*NE1431*~*NE1434* の 4 遺伝子を含む共通の配列を見出すことができた (Fig. 2-8(A))。相補に必須な遺伝子 (領域) を確かめるため、取得したプラスミドを *HindIII* で処理した後、セルフライゲーションを行うことで *NE1434* (のみ) 完全長 ORF が含まれるプラスミドを作製した。これにより、*E. coli*  $\Delta$ *pabABC* 株の生育が相補されることが確認されたため、*NE1434* が相補に必須であることが示された。

(A)

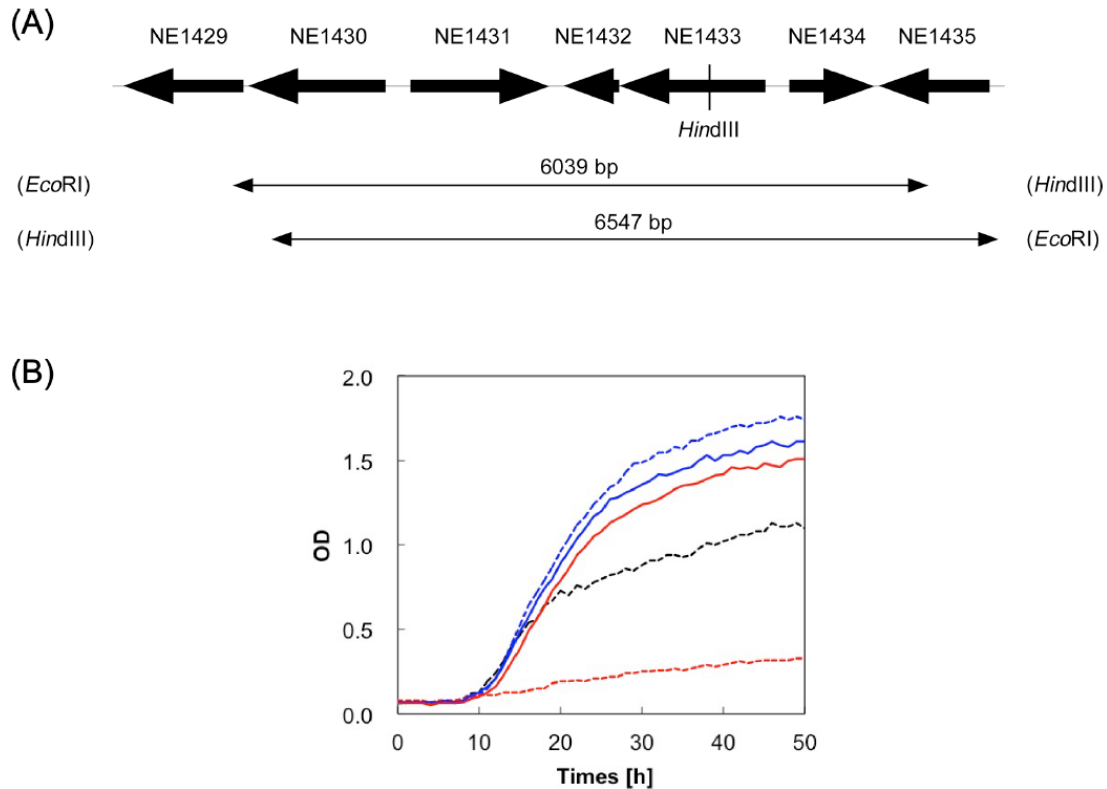


(B)



**Fig. 2-7 *In vitro* assay of the NE2150 gene product.**

(A) SDS-PAGE analysis of purified N-terminal His-tagged NE2150 protein (56.6 kDa). M, marker; C, crude lysate (20  $\mu$ g); P, purified protein (10  $\mu$ g). An aliquot (20 mL) of overnight culture of *E. coli* BL21(DE3) harboring pET-NE2150 was inoculated into 1 L of fresh LB media and cultured at 30°C to OD 0.5. Then, IPTG was added at a final concentration of 0.5 mM and cultivation was continued for an additional 16 hr. After the cells were harvested and washed once with chilled buffer A (50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl; pH 8.0) containing 20 mM imidazole, they were suspended in 40 mL of the same buffer. Protein purification was performed according to the manufacturer's instructions. The sample was desalted using an Amicon apparatus (Millipore, Bedford, MA, USA) with buffer B (10 mM sodium phosphate, 60 mM NaCl; pH 8.0). The purity of the recombinant enzyme was checked by SDS-PAGE. (B) LC-MS analysis of the reaction product. Enzyme assay reported by He *et al.* (2004) was slightly modified. The assay mixture contained, in a final volume of 200  $\mu$ L, 100 mM bicine (pH 8.5), 10 mM chorismate, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl, and a suitable amount of recombinant NE2150. This mixture was incubated at 30°C for 60 min and then deproteinized using an Amicon apparatus (Millipore). The samples (2  $\mu$ L) were analyzed by LC-MS (middle). Analytical conditions were the same as those used for the examination of pABA productivity. The UV chromatogram (284 nm, left column) and selected ion chromatogram for  $m/z = 138.056 \pm 89 0.010$  (corresponding to the [M+H]<sup>+</sup> ion for anthranilate, right column) are shown. Standard anthranilate (upper) and a control experiment without the enzyme (lower) are also shown.



**Fig. 2-8 Shotgun cloning experiment with the *E. coli*  $\Delta$ *pabABC* mutant and genomic DNA of *N. europaea* NBRC 14298**

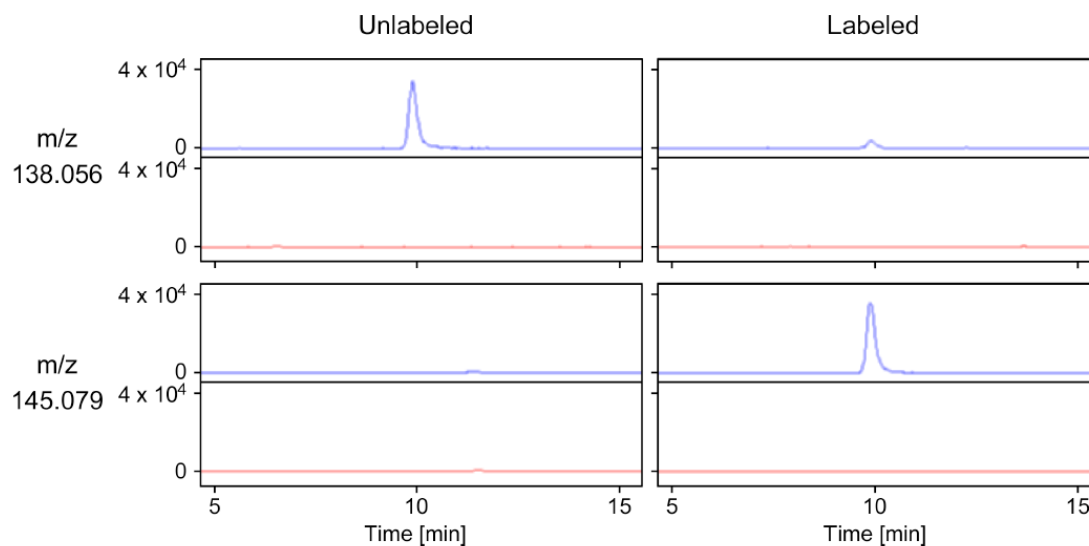
(A) DNA fragments obtained by shotgun cloning are shown schematically. The predicted function of each gene is as follows: *NE1429*, anhydro-N-acetylmuramic acid kinase; *NE1430*, M23/M37 family peptidase; *NE1431*, tyrosyl-tRNA synthetase; *NE1432*, transcriptional regulator; *NE1433*, serine hydroxymethyltransferase; *NE1434*, pyrroloquinoline-quinone synthase; *NE1435*, transcription regulator. Parentheses indicate restriction sites in pSTV29 cloning vector. (B) Growth curves of *E. coli* BW25113 (parent strain) harboring pUC18 (blue dashed line), *E. coli* BW25113 harboring pUC-NE1434H (blue line), *E. coli*  $\Delta$ *pabABC* mutant harboring pUC-NE1434H (red line), *E. coli*  $\Delta$ *pabABC* mutant harboring pUC18 (red dashed line), and *E. coli*  $\Delta$ *pabABC* mutant (black dashed line) supplemented pABA in M9 minimum medium are shown.

### 2-2-5. NE1434 の PABA 生合成への関与の検証

NE1434 の PABA 生合成への関与について更に確かめるため、NE1434 遺伝子を発現するプラスミドを持つ、或いは持たない *E. coli* BW25113 株（親株）と  $\Delta$ pabABC 株を作製し、M9 培地における生育を比較した。その結果、Fig. 2-8(B)に示すように、NE1434 の発現により  $\Delta$ pabABC 株は親株と同等の生育を示すことがわかった。このことから、NE1434 が PABA 生合成に関与することが強く示唆された。

NE1434 は以前に pyrroloquinoline-quinone (PQQ) synthase (PqqC)としてアノテーションされていた遺伝子であった。しかしながら、NE1434 と PqqC の相同性は低く、例えば *Klebsiella pneumoniae* KPN01811 と比べると identity 24%、similarity 40%、*Pseudomonas putida* PP0378 と比べると identity 29%、similarity 39%であった (Shen *et al.*, 2012)。また、PQQ 生合成に関連する他の遺伝子が NE1434 周辺に存在していないことから、NE1434 は PABA 生合成に関与する新規酵素であると考えられた。

NE1434 が PABA の生合成に関与していることを更に確かめるため、[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]glucose を用いたトレーサー実験を行った。<sup>13</sup>C NMR 解析には mg オーダーのラベル化された PABA が必要となるが、一般に補酵素やビタミンの産生量は極めて少量であるため、最初に NE1434 を発現するプラスミド (pUC-NE1434H) を持つ *E. coli*  $\Delta$ pabABC 株の PABA 生産性について調べた。M9 培地で培養後、HPLC と LC-MS で培養液と細胞抽出液に含まれる PABA について解析した結果、LC-MS においてのみ PABA の検出が認められ ( $[M + H]^+ = 138.056$ , Fig. 2-9, left column)、その生産性は極めて低くラベル化された PABA の精製は困難であることがわかった。このため、PABA が [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]glucose を単一炭素源とした際に *de novo* 合成されるかどうかの検証を行った。その結果、<sup>13</sup>C ラベルされた PABA ( $[M + H]^+ = 145.079$ ) が pUC-NE1434 を発現する *E. coli*  $\Delta$ pabABC 株において特異的に検出された (Fig. 2-9, right column)。このことから、NE1434 が PABA の *de novo* 合成に関わっていることがわかった。



**Fig. 2-9 Tracer experiment using [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]glucose as the sole carbon source**

The *E. coli*  $\Delta pabABC$  mutant expressing the NE1434 gene was cultivated with unlabeled (left column) and [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]glucose (right column). After cultivation for 72 h, the culture broth was analyzed by LC-MS. The upper two chromatograms were selected for  $m/z = 138.056 \pm 0.010$ , which corresponds to the  $[M + H]^+$  ion for pABA with all unlabeled carbon. The lower two chromatograms were selected for  $m/z = 145.079 \pm 0.010$  corresponding to the  $[M + H]^+$  ion for <sup>13</sup>C-labeled pABA. The upper line (blue) and lower line (red) in all four chromatograms indicate *E. coli*  $\Delta pabABC$  harboring pUC-NE1434H and *E. coli*  $\Delta pabABC$  harboring pUC18 (control), respectively.

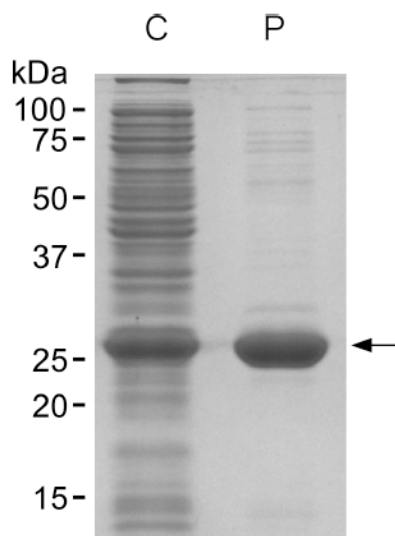
## 2-2-6. NE1434 の基質の探索

NE1434 の機能を明らかにするために、以下に記すように基質の探索を行った。

既知経路において、PABA はコリスミ酸を出発に、PabAB (aminodeoxychorismate synthase) と PabC (aminodeoxychorismate lyase) により生合成される。そこで、C 末端に His タグを付与した融合タンパク質 NE1434-His を調製し、コリスミ酸と反応するかどうか調べた (Fig. 2-10)。しかしながら、Fig. 2-10 に記したように、NAD(P)<sup>+</sup>や PLP 等の補酵素や Mg<sup>2+</sup>や Fe<sup>2+</sup>等の金属類を添加した、あるいは pH 条件を変えた様々な反応条件においても、生成物は認められなかった。

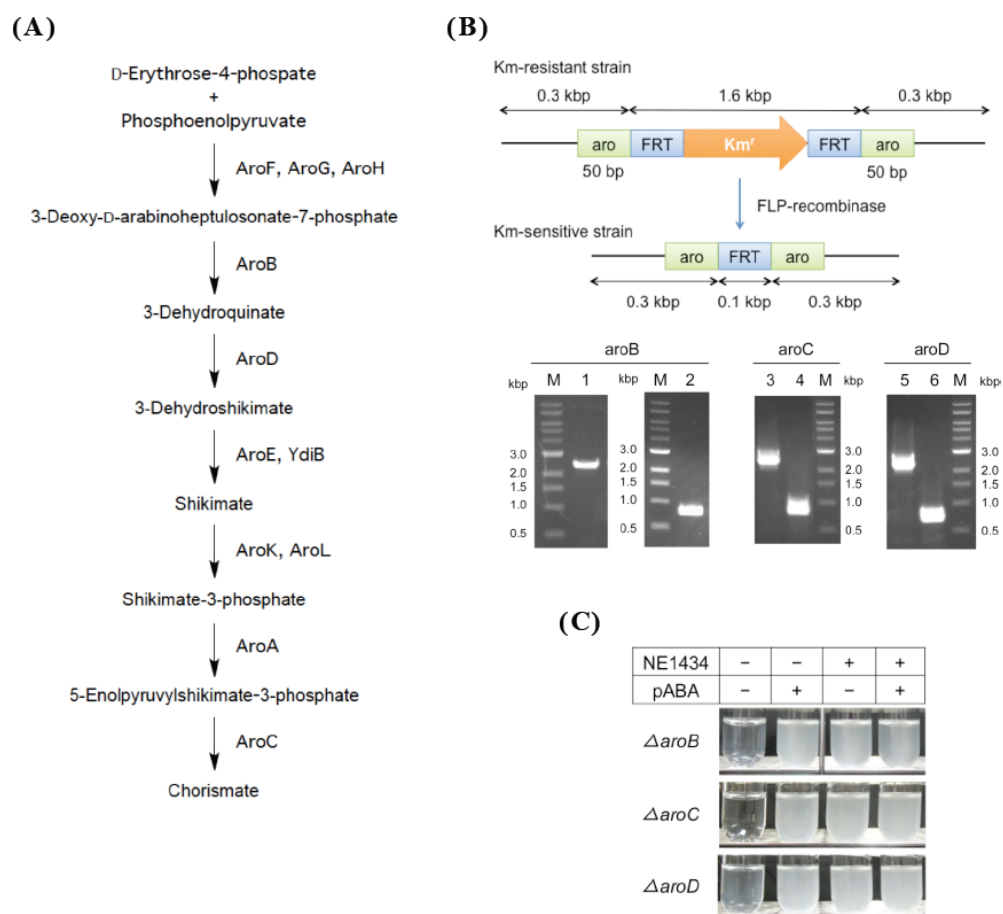
コリスミ酸以外に、シキミ酸経路における 3-dehydroquinate が PABA の前駆体となることも知られている (Porat *et al.*, 2006)。そこで、NE1434 がシキミ酸経路上の化合物を利用するかどうかを遺伝学的方法で検証した。*E. coli*  $\Delta$ pabABC 株より、*aroB* (3-dehydroquinate synthase)、*aroC* (chorismate synthase)、*aroD* (3-dehydroquinate dehydratase I)を破壊した株をそれぞれ作製し、それらの株が生育に芳香族アミノ酸、4-hydroxy benzoate 及び PABA が必要であることを確認した。*aroB* を破壊した株は 3-dehydroquinate からコリスミ酸、*aroD* を破壊した株は 3-dehydrosikimate からコリスミ酸、*aroC* を破壊した株はコリスミ酸が産生されないと考えられるが、これらの株に NE1434 を発現させるプラスミドを導入した結果、いずれの株においても PABA を含まない培地で生育が認められた (Fig. 2-11)。このことは、3-dehydroquinate からコリスミ酸に至るシキミ酸経路上の中間体が、NE1434 を介した PABA 生合成に関与しないことを示唆する。更に、芳香族アミノ酸や 4-hydroxy benzoate が NE1434 の基質となるか *in vitro* における検証を行ったが、生成物は認められなかった。このことから、*N. europaea* においては全く新しい酵素、或いは経路により PABA が生合成されていると結論付けた。

続いて、NE1434 の基質が、ある遺伝子により生合成されている可能性を考え、NE1434 を発現する *E. coli*  $\Delta$ pabABC 株より PABA 要求性変異株の単離を試みた。試験にあたり、*E. coli*  $\Delta$ pabABC 株の *tnaA* locus (tryptophanase gene) に NE1434 を組み込んだ株を作製した (Fig. 2-12)。この株を *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) で処理し、PABA 要求性を示す株のスクリーニングを行った。その結果、ペニシリン濃縮を行い凡そ 30000 コロニーを取得したが、その中から PABA 要求性を示す株を取得することができなかった。このことから NE1434 の基質の生合成に関与する遺伝子が必須遺伝子である可能性は示唆されたものの、本手法においても NE1434 の基質のヒントを得ることはできなかった。



**Fig. 2-10 Purification of C-terminal His-tagged NE1434 protein and *in vitro* assay using the purified protein**

C-terminal His-tagged NE1434 protein (28.9 kDa) was purified from the cell lysate of *E. coli* JM109 harboring pUC-NE1434H by the same method used for NE2150 purification and analyzed by SDS-PAGE. C, crude lysate (20  $\mu$ g); P, purified protein (10  $\mu$ g). *In vitro* assay was carried out in 100 mM of sodium phosphate (pH 7.5) or bicine (pH 8.5) at 30°C for 1 or 20 h. Chorismate was used as substrates. Glutamine, glycine, alanine, NH<sub>4</sub>Cl were used as donors of amino group. NAD(P)H, NAD(P)<sup>+</sup>, PLP, FAD, ascorbate, MgCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> were added into the reaction mixture as cofactors. Reaction mixtures (10  $\mu$ L) were analyzed using a Shimadzu LC-20 system (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). The analytical conditions were as follows: InertSustain C18 column (150 mm  $\times$  4.6 mm ID, 5  $\mu$ m; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan); column temperature, 35°C; isocratic flow, 5% (v/v) acetic acid:acetonitrile = 95:5; flow rate, 1 mL/min. Eluted compounds were detected by a diode array spectrophotometer. However, no product was detected in the all samples.

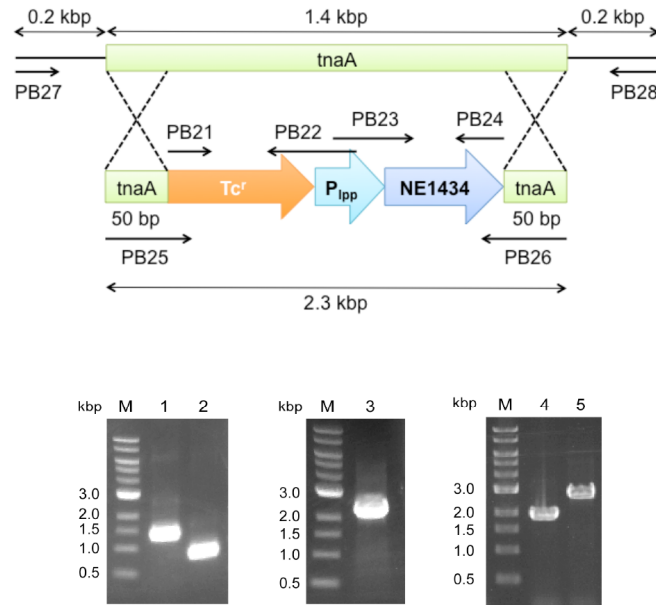


**Fig. 2-11 Construction of *aroB*, *aroC*, and *aroD*-knockout mutants from the *E. coli* *ApabABC* mutant**

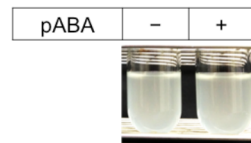
(A) The shikimate pathway. (B) To construct *aroB*, *aroC*, and *aroD* disruptants, the Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Kit (Gene Bridges GmbH, Heidelberg, Germany) was used according to the manufacturer's protocol. In brief, DNA fragments containing a Km-resistance gene cassette (Gene Bridges GmbH) flanked with FRT sites and 50-bp homologous arms whose sequences were identical to the target regions were amplified by PCR with appropriate sets of primers. The amplified DNA fragments were used to transform the *E. coli* *ApabABC* mutant harboring the pRedET plasmid. Gene-disruption in Km-resistant colonies was checked by PCR (lane 1, 3, and 5) using appropriate sets of two primers that hybridized approximately 300 bp up- and downstream of the target genes. Furthermore, the sequences of the amplicons were analyzed to confirm the deletion. The selection marker in the obtained mutants was removed with FLP-recombinase and the gene deletions were confirmed by PCR (lane 2, 4, and 6) and direct sequencing of the amplicons. (C) Disruption of *aroB*, *aroC*, and *aroD* in *E. coli* *ApabABC* harboring pUC-NE1434H had no effect on its growth. Each of the three types of transformants (triplicate) was grown on LB plates, dispersed in 200  $\mu$ L of sterilized distilled water and then a 30  $\mu$ L aliquot was inoculated into 3 mL of M9 media containing Phe, Tyr, Trp, and 4-hydroxy benzoate with/without pABA (10  $\mu$ g/mL). Their growth was assessed after 2–3 days cultivation at 30°C.



(A)



(B)



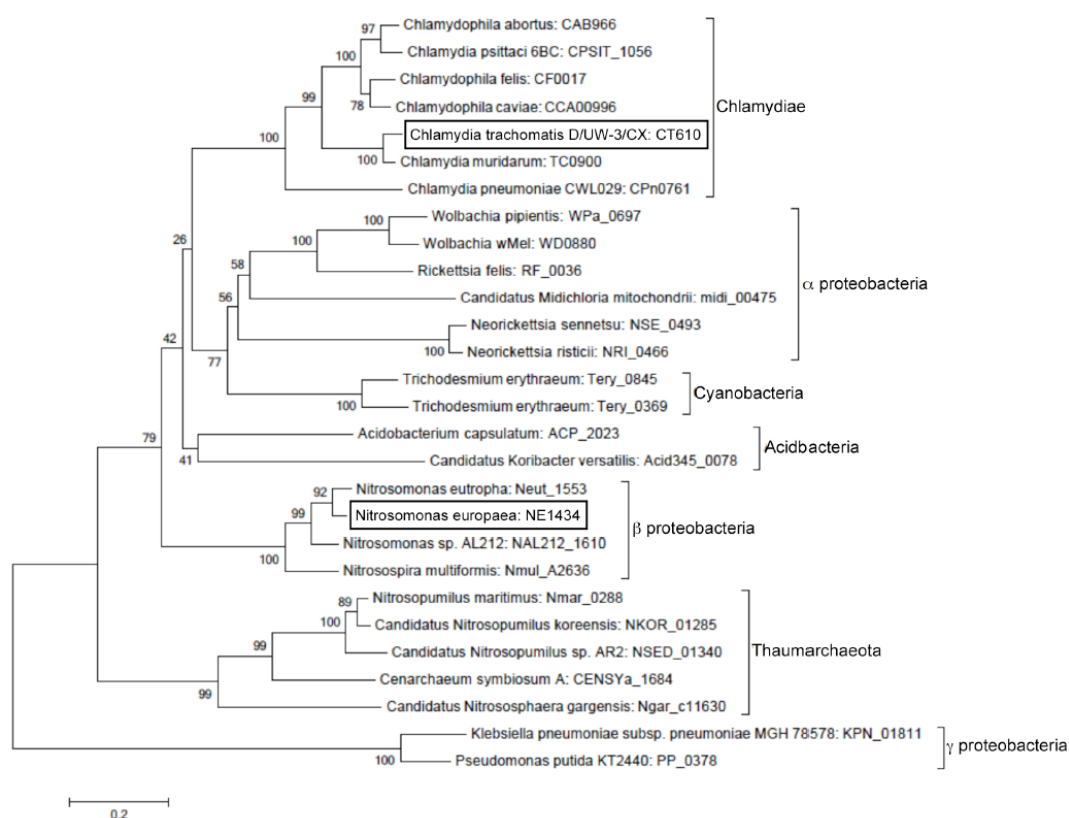
**Fig. 2-12 Construction of a host strain to isolate a pABA auxotrophic mutant from *E. coli*  $\Delta pabABC$  expressing the NE1434 gene**

(A) To express the *NE1434* gene constitutively in the *E. coli* chromosome, the gene was integrated into the *tnaA* locus (tryptophanase gene) in *E. coli*  $\Delta pabABC$  using the Red/ET recombination system (Gene Bridges GmbH). The DNA fragment used for integration was constructed in three steps; first, the tetracycline resistance gene (*Tc<sup>r</sup>*) and part of the lipoprotein promoter (*P<sub>lpp</sub>*) were amplified by PCR with the primers PB21 and PB22 (lane 1), which target the N-terminus of the *Tc<sup>r</sup>* gene and the 5'-half of *P<sub>lpp</sub>*, respectively; second, the other part of *P<sub>lpp</sub>* and the *NE1434* gene were amplified with PB23 and PB24 (lane 2), which target the 3'-half of *lpp* and the C-terminus of *NE1434*, respectively; third, to assemble the two amplicons with arms for the *tnaA* gene, PCR was carried out with both of the amplicons and the primers PB25 and PB26 (lane 3). The former and the latter carry 50-bp N-terminal and C-terminal sequences of *tnaA*. To obtain an *NE1434*-integrated strain, the *E. coli*  $\Delta pabABC$  mutant harboring pRedET was transformed with the amplified DNA fragment and selected on LB plates containing Tc. The gene-integration of Tc-resistant colonies was checked by PCR using two primers, PB27 and PB28, which hybridize approximately 200 bp up- and downstream of the *tnaA* gene, respectively (lane 4, parental strain; lane 5, the *NE1434*-integrated strain). Furthermore, the sequence of the amplicon was confirmed. (B) The *NE1434*-integrated *E. coli*  $\Delta pabABC$  strain thus obtained was confirmed to be able to grow in M9 media without pABA in the same way as *E. coli*  $\Delta pabABC$  harboring *NE1434* gene on the plasmid.

## 2-2-7. NE1434 オルソログの分布

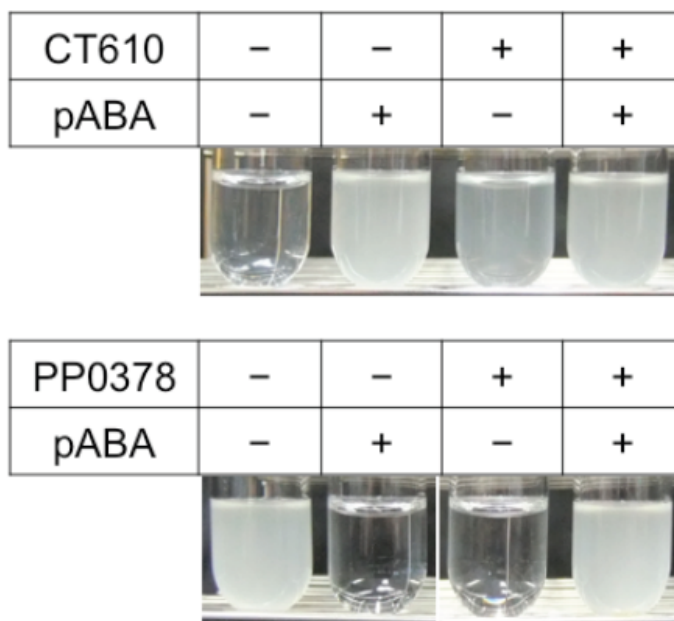
NE1434 遺伝子は、以前に *pqqC* とアノテーションされた遺伝子であり、Pfam のうち TenA/Thi4/PqqC family の一つとされる (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)。NE1434 オルソログの分布について BLASTP および MEGA5 プログラム (Tamura *et al.*, 2011) を用いて調べた。BLASTP では NE1434 のアミノ酸配列を query とし、E-value  $10^{-24}$  を上限として、PQQ 生合成の遺伝子クラスターを持たない原核生物のゲノムデータベース (Shen *et al.*, 2011) を対象にオルソログを収集した。Fig. 2-13 に、*K. pneumoniae* や *P. putida* といった PQQ 生合成に関与することが確認されている PqqC オルソログを含む進化系統樹を示した。オルソログの分布は2つのグループに分かれ、1つは *Nitrosomonas* や *Nitrosopumilus*、*Thaumarchaeota* といったアンモニア酸化菌や窒素固定菌である *Trichodesmium erythraeum* のグループであり、もう1つは *Chlamydia*、*Chlamydophila*、*Wolbachia*、*Rickettsia*、*Neorickettsia* といった偏性細胞内寄生性細菌のグループであった。

*Chlamydia* においては、*Chlamydia trachomatis* が葉酸生合成の遺伝子クラスター：*folA* (CT614)、*folP* (CT613)、*folX* (CT612)、*folB* オルソログ)を有していることが知られている (Stephens *et al.*, 1998)。データベース上には *pabA*、*pabB*、*pabC* オルソログは存在しないが、NE1434 のオルソログである CT610 (identity 40%、similarity 60%) が *folAPX* クラスターの下流に同じ方向で存在する。CT610 が PABA 生合成に関与するかを確認するため、NE1434 を発現させたプラスミドと同じコンストラクトのプラスミド (pUC-CT610H) を作製し、*E. coli* *ApabABC* 株の PABA 要求性が相補されるかどうか検討した。その結果、Fig. 2-14 に示した通り、NE1434 と同様に CT610 の発現により PABA 要求性が相補されることが確認された。対照的に、*P. putida* KT2440 株の PQQ 遺伝子クラスター上に存在する *pqqC* 遺伝子である PP0378 (identity 25%、similarity 39%) (Nelson *et al.*, 2011) を発現するプラスミド (pUC-pqqC) の導入では、*E. coli* *ApabABC* 株の PABA 要求性を相補することができなかった。このことから、PP0378 は PQQ 生合成に関与し、CT610 は勿論、NE1434 と相同性の高いオルソログについては PABA 生合成に関与することが示唆された。



**Fig. 2-13 Phylogenetic tree of NE1434 and its orthologs**

The sequences of the *NE1434* gene product and its orthologs were aligned using MEGA5. A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. The numbers on the tree indicate percentages from bootstrap sampling with 1000 replications.



**Fig. 2-14 Complementation assay of the *E. coli*  $\Delta pabABC$  mutant using the *CT610* gene from *C. trachomatis* and the *pqqC* gene from *P. putida***

For the pABA auxotrophy complementation assay, pUC-CT610H and pUC-pqqC were introduced into the *E. coli*  $\Delta pabABC$  mutant and the growth of the transformants was examined. Experimental procedures were the same as those used for the same experiment with *E. coli*  $\Delta pabABC$  harboring pUC-NE1434H.

## 2-3. 考察

幾つかの細菌は PABA 生合成に必須とされる *pabA*、*pabB*、*pabC* オルソログが存在しないのにも関わらず、PABA 非要求性を示した。本研究において、*N. europaea* における NE1434 は、*pqqC* とアノテーションされているものの相同性は低く、PABA の *de novo* 合成に関与していることが示された。*C. trachomatis* における CT610 についても、NE1434 のオルソログであり、更には葉酸生合成遺伝子クラスターの近傍(或いは一部として)存在し、*E. coli*  $\Delta$ *pabABC* 株の PABA 要求性を相補した (Fig. 2-14)。

一方、*L. fermentum* IFO 3956 株のゲノム DNA からは、PABA 要求性の相補に関わる遺伝子を取得することができなかった。*L. fermentum* IFO 3956 株は NE1434 遺伝子のオルソログを有していないことから、離れた遺伝子座に位置する 2 つ以上の遺伝子が PABA 生合成に関わっていると推測される。或いは、基質として異なる化合物を使った全く異なる機構で PABA を生合成していることも考えられる。

NE1434 の基質については、様々なアプローチでその同定が試みられた。コリスミ酸や 3-dehydroquinate のようなシキミ酸経路の中間体が PABA 生合成の基質として使われている (Porat *et al.*, 2006) 可能性が考えられたが、NE1434 はコリスミ酸と反応する様子は伺えなかった。また、NE1434 を発現する *E. coli*  $\Delta$ *pabABC* 株より *aroB*、*aroC*、*aroD* をそれぞれ破壊した株は、いずれも生育に PABA を必要としなかった。このことからシキミ酸経路上の中間体化合物は NE1434 の基質でないことが示唆された。

*C. trachomatis* における CT610 については、最近、別のグループにより報告がなされている (Adam *et al.*, 2014)。この中で、*E. coli*  $\Delta$ *pabA* 株の PABA 要求性を相補する遺伝子を *Chlamydia trachomatis* のゲノムライブラリーよりスクリーニングしたところ CT610 のオルソログである *ctl0874* が見出されたこと、CT610 は *E. coli*  $\Delta$ *pabB* 株や  $\Delta$ *pabC* 株の PABA 要求性を相補したこと、また *E. coli*  $\Delta$ *aroA* 株、*E. coli*  $\Delta$ *pabA* $\Delta$ *aroD* 株、*E. coli*  $\Delta$ *pabA* $\Delta$ *aroB* 株においても CT610 が PABA 要求性を相補できることから CT610 がコリスミ酸、シキミ酸、3-dehydroquinate 以外の化合物を基質にする可能性があること、更には *E. coli*  $\Delta$ *ubiC* 株においても CT610 の発現により PABA 非要求性となることからコリスミ酸からユビキノンに至る中間体についても基質ではないであろうことが確認されている。しかしながら、依然、基質が何であるかは特定されていない。

本研究の中で、*in vitro* における組換えタンパク質を用いた解析、遺伝学的な検証、またトレーサー実験が行われたが、NE1434 の基質のヒントは得られなかった。NE1434 は、既に基質や生成物が既知である PqqC と相同性を示すため、PqqC の詳細な反応メカニズムを追求することが NE1434 の基質を同定する近道になるのかもしれない。或いは、NE1434 の結晶構造解析がそのヒントになることも考えられる。また、NE1434 のオルソログが、*pabA*、*pabB*、*pabC* を持たないアンモニア酸化菌や古細菌に特に分布が目立つことや、CT610 が、腫瘍壊死

因子ファミリー受容体の death ドメインへの結合を介して宿主のアポトーシスを調製する機能を持つ (Schwarzenbacher *et al.*, 2004) こともまた、基質の同定に重要な事実なのかもしれない。

葉酸生合成経路は、抗細菌性、抗寄生虫性薬のターゲットとして注目されてきた (Bermingham *et al.*, 2002)。Sulfonamide や diaminopyrimidine の抗生物質がその例である。系統樹解析 (Fig. 2-13) で示したように、偏性細胞内寄生性細菌である *C. trachomatis* や *Neorickettsia sennetsu* は NE1434 オルソログを持つ。NE1434 オルソログは動物細胞では見つからないため、病原菌に高い特異性を示す抗生物質のための魅力的なターゲットと考えられる。

### 第3章 新規メナキノン生合成経路における MqnA 及び MqnB の解析

本章の内容は、共著論文として学術雑誌に掲載されており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。本章の内容は、ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY Vol.55, No.2, pp.913-916 に掲載されている。

## 総括及び展望

近年、大きな技術革新を伴い発展してきたゲノム解析の技術・手法により、数多くの生物のゲノム情報が明らかとなってきた。ゲノムサイズが数 Mbps 程度の細菌に関しては、次世代シーケンサー技術を用いれば、アノテーション等のバイオインフォマティクス解析も含め 1~2 ヶ月あれば安価に全ゲノムの解読が可能な時代である。代謝経路の研究は、それよりも随分と前から進められており、微生物の中では特にモデル生物として位置付けられてきた大腸菌において、数多くの知見が蓄積されている。関連酵素や遺伝子、それらの制御を含む代謝経路に関する膨大な情報は、代表的なデータベースである KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) や ECOCYC (<http://ecocyc.org/>) より必要に応じて簡単に取り出すことが可能である。

しかしながら、微生物の中には、それらモデル微生物で確立されきた代表的な情報とはやや異なる経路を有する場合があることも明らかになりつつある。イソペンテニルニリン酸生合成に関わる MEP (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate) 経路 (Takagi *et al.*, 2002)、*Thermus thermophilus* において見出された AAA ( $\alpha$ -Aminoadipic acid) からのリジン新規生合成経路 (Nishiyama, 2004)、*Streptomyces coelicolor* において見出された Fualosine (FL) を介した MK 新規生合成経路 (Hiratsuka *et al.*, 2008) 等は、その代表的な例と言える。また、補酵素の生合成においては、ピリドキサールのピリジン環が、大腸菌では 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) と 3-amino-1-deoxyacetone-1-phosphate から 7 段階で生合成されるのに対し、枯草菌では、ribulose-phosphate、glyceraldehyde-phosphate、アンモニアから 1 つの酵素反応で生合成され (Begley, 2006)、逆に NAD の生合成では、従来真核生物にしか存在しないと考えられていた tryptophan-kynurenine 経路がキサントモナス目やフラボバクテリウム目に存在することが明らかにされる等 (Lima *et al.*, 2009)、補酵素生合成の多様性が明らかになりつつある。最近ではセリンの生合成に関して、3-phosphoserine の脱リン酸にこれまでとは全くタイプの異なる酵素が関与していることも明らかとなり (Chiba *et al.*, 2012)、一次代謝経路にもこれまでは知られていなかった多様性が存在することが予想される。このような事例は、新規生合成経路が他にも多く存在する可能性を期待させるのに十分であった。

本研究においては、多くの栄養要求性を示す一方で、近年のゲノム解析によりゲノムサイズが数 Mbp 程度と比較的大きいことがわかった *Lactobacillus* 属に着目し、新規一次代謝経路 (アミノ酸、核酸系物質、ビタミン) の探索を行った。多くの場合、期待に反しゲノム情報と栄養要求性の結果は一致したが、アミノ酸では *Lactobacillus fermentum* におけるグルタミン酸やセリン・システイン生合成に関して、核酸系物質では *L. fermentum* における GMP 生合成や *Lactobacillus gasseri* における UTP から CTP、dTTP に至る生合成に関して、ビタミンでは *L. fermentum* におけるビタミン B6、葉酸 (PABA)、*Lactobacillus reuteri* における葉酸 (PABA)、



*L. gasseri* におけるチアミン・リボフラビン・葉酸生合成に関して新規生合成経路を有している可能性を見出すことができた。

この中で、*L. fermentum* と *L. reuteri* で認められた、コリスミ酸から *p*-アミノ安息香酸 (PABA) を合成する遺伝子が存在しないにも関わらず葉酸要求性を示さなかった現象について、詳細に検証した。*in vitro* での検討の中で、葉酸生合成で PABA を基質とする *folP* オルソログである LAF1336 が、*FolP* と同様に PABA を基質とすることが明らかとなり、*in vivo* 検討の中で、生育不良を示した *folP* 欠損大腸菌が LAF1336 の発現により相補されることが明らかになったことで、少なくとも *L. fermentum* においては PABA が新規経路で生合成される可能性が示された (Kuratsu *et al.*, 2010)。

更に、既知経路の PABA 合成に関与する *pabA*、*pabB*、*pabC* 欠損大腸菌を宿主に用い、新規経路を有すると推定され、かつ入手可能な *L. fermentum*、*Nitrosomonas eutropha* を DNA 供与体としてショットガンクローニングを行った結果、*N. eutropha* から pyrroloquinoline quinone (PQQ) synthase と弱い相同性を持ち、機能未知とアノテーションされている候補遺伝子を取得することができた。本遺伝子のオルソログは、同じく新規経路を持つと予想される *Chlamydia* では、他の葉酸生合成遺伝子と染色体上でクラスターを成していることから、PABA の生合成に関与する可能性が強く示唆された (Satoh *et al.*, 2014)。不思議なことに、*L. fermentum* のゲノムデータベースには本遺伝子のオルソログは存在しなかった。この事実は、*L. fermentum* には既知経路や *N. eutropha* とは異なる第3の経路が存在する可能性を示唆する。葉酸生合成経路は、抗細菌性、抗寄生虫性薬のターゲットとして注目されており、*C. trachomatis* や *Neorickettsia sennetsu* が本遺伝子のオルソログを持ち、動物細胞ではそのオルソログは見つかっていないため、病原菌に高い特異性を示す抗生物質のための魅力的なターゲットと考えられる。

*N. eutropha* において見出された NE1434 がどのように PABA 生合成に関与するのかは、今後明らかにするべき命題である。本研究においては、*in vitro* での基質探索、また NE1434 の基質がある遺伝子により生合成されていると仮定し、NE1434 を発現する *E. coli*  $\Delta$ *pabABC* 株より PABA 要求性変異株の単離を試みたが、PABA 要求性を示す株を取得できず断念した。今後、これらの検討を継続して行う余地はあるが、結晶構造がわかれば良いヒントが得られるのかもしれない。NE1434 の 1 遺伝子で *E. coli*  $\Delta$ *pabABC* 株の PABA 要求性を相補できたという事実から、複雑な経路で PABA が生合成されているわけではないことが予想される。NE1434 と相互作用する *E. coli* の候補タンパク質を Pull-down assay や two-hybrid 法等で見出すことができれば、反応メカニズムの解明に近づくものと考えられる。一方で、*L. fermentum* においては現在までに PABA 生合成に関与する遺伝子の同定に至っていない。ショットガンクローニングで候補遺伝子を取得できなかったことから、生合成関連遺伝子が複数の遺伝子座に跨って存在している可能性が考えられる。今後、BAC やコスミド等のライブラリーを作製することで、候補遺伝子の取得が可能かもしれない。*N. eutropha* や *C. trachomatis* 等と *L. fermentum* では PABA 生合成の経路が異なるのかどうかは、抗生物質等の阻害剤のターゲット

を考える上でも非常に興味深い。今後のメカニズムの解明が大いに期待される。

また、本研究の中で MK 新規生合成経路の解析も行った。出発物質であるコリスミ酸からの初発反応の解析を試みた結果、その詳細を明らかにすることはできなかったが、FL から DHFL が生成する MqnB オルソログに関して、*S. coelicolor*、*T. thermophilus*、*Acidthermus cellulolyticus*、*Helicobacter pylori* が有する各遺伝子の機能解析を行い、コリスミ酸から DHFL に至る経路に多様性がある（FL の hypoxanthine 部位が adenine 部位となった Aminodeoxyfutasine (AFL) がその経路の中間に関与する場合がある）ことを明らかにすることができた (Arakawa *et al.*, 2011)。この中で、AFL が直接 DHFL に変換される経路は *H. pylori* のみが有しており、本反応の阻害剤が特異的抗ピロリ菌剤となる可能性が考えられる。MqnA に関しては、本研究でも確認された 3-(1-carboxyvinyl) benzoate と、嫌氣的に精製した TTHA0804 及び S-adenosyl-L-methionine により AFL が生成することが *in vitro* で証明された (Mahanta *et al.*, 2013)。このことから、MqnA の生成物は FL ではなく AFL であり、その後 DHFL に至る経路に FL を介す場合と介さない場合があることが示された。*T. thermophilus* では、MqnB の解析結果からおそらく FL を介すことが予想されるが、AFL から FL へ変換する候補タンパク質は明らかとなっておらず、今後の検討が期待される。また、FL を介さない経路を持つものとして、現時点では *H. pylori* しか見つかっておらず、抗ピロリ菌剤として非常に有望なターゲットとなる可能性を秘めている。

本研究により、PABA の新規生合成経路の存在が明らかとなり、また MK 新規生合成経路における AFL を介した多様性の存在が明らかとなったことで、微生物の多様性やその進化を考える上でも重要な生理学的な新たな知見を得ることができただけでなく、応用面でも有用な抗生物質の開発等に繋がる有力な手掛かりをも得ることができた。今後、新規生合成経路の更なる詳細の解明、更には本研究で見出された経路（反応）に特異的な阻害剤の探索を通し、ヒトにとって有効かつ安全性の高い抗生物質の開発が期待される。

## 実験方法

### 『第 1 章、第 2 章』

#### 使用試薬

本文中に示す化合物は全て特級グレードの試薬を使用した。

#### 使用菌株及び培地

*L. fermentum* IFO 3956 株、*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842 株、*N. europaea* NBRC 14298 株は、NITE（独立行政法人製品評価術基盤機構）のバイオテクノロジーセンター（NBRC）より入手した。また、*L. reuteri* JCM 1112 株、*L. gasseri* ATCC33323 株、*L. brevis* ATCC 367 株については、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室（JCM）より入手した。培地は、LB 培地（LB Broth Base; Invitrogen™）、M9 培地（M9 minimal salts (Becton, Dickinson and Company)、0.4 % (w/v) Glucose、5 mM MgSO<sub>4</sub>、0.1 mM CaCl<sub>2</sub>）を使用し、プレートには 1.5% (w/v) Agar を使用した。また、必要に応じてアンピシリン（終濃度 100 µg/ mL）、クロラムフェニコール（終濃度 30 µg/ mL）、カナマイシン（終濃度 25 µg/ mL）、ストレプトマイシン（終濃度 50 µg/ mL）を添加した。

#### オルソログ探索

KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>))、DDBJ (DNA data bank of Japan) の GIB (Genome information broker)、BioCyc Database Collection (<http://biocyc.org/>) のサイトを利用して、既知である一次代謝経路の *Lactobacillus* 属におけるオルソログの有無を調査した。また KEGG サイトを利用して、*Escherichia coli* K-12 MG1655 株、或いは *Lactobacillus plantarum* WCFS1 株のオルソログを query に BLAST 検索を行い、E-value を求めた。なお、基本的には cut off value を E-value =10<sup>-5</sup> に設定した。

#### プラスミド構築

構築プラスミド及び使用 primer の一覧を Table 4-1 に示した。プライマーは全てゲノム DNA 配列を基に設計した。*pabB* ホモログである NE2150 は、*N. europaea* のゲノム DNA を鋳型に、PrimeSTAR GXL DNA polymerase（タカラバイオ社）を使用して PCR により増幅した。PCR 反応は、添付プロトコルで推奨されている組成及び条件にて行った。増幅した DNA 断片を *NdeI* 及び *BamHI* で処理した後、pET28 ベクター（メルク社）の該当部位へクローニングを行うことで、N 末端に His タグが付加された NE2150 を発現するプラスミドを構築した (pET-NE2150)。また C 末端に His タグが付与された NE1434 を発現する目的で、同様の方法

で PCR にて取得した DNA 断片を *Bam*HI 及び *Hind*III で処理し、pUC118 ベクター (タカラバイオ社) へクローニングし pUC-NE1434H を構築した。更に、*C. trachomatis* strain UW-3/Cx 株 (ATCC VR-885D) の *CT610*、及び *Pseudomonas putida* KT2440 株の *pqqC* を発現する目的で、Table 4-1 に示すプライマーで PCR にて取得した DNA 断片を *Bam*HI 及び *Hind*III で処理し、pUC18 ベクター (タカラバイオ社) にクローニングを行うことで、それぞれ pUC-CT610H 及び pUC-pqqC を取得した。なお、増幅断片については ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems Japan) を使用し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit にてシーケンスの確認を行った。

**Table 4-1 Primers used for Plasmids construction**

Plasmid Name	Primer Sequence(5' - 3')
pQE-30: cysE	tttggatccTCGTGTGAAGAACTGGAAATTGCTCTGGAAC ttaaagcttTTAGATCCCATCCCCATACTCAAATGTATGG
pMAL-c2x: cysE	tttggatccTCGTGTGAAGAACTGGAAATTGCTCTGGAAC ttaaagcttTTAGATCCCATCCCCATACTCAAATGTATGG
pQE-30: LAF0855	tttggatccGCACAATTAGACGCGCAAGCAATCATTAAC ttaaagcttTTAGAGCTTCCTCAAATCGTCTCCAGC
pMAL-c2x: LAF0855	tttggatccGCACAATTAGACGCGCAAGCAATCATTAAC ttaaagcttTTAGAGCTTCCTCAAATCGTCTCCAGC
pUC118: folP	ttagaatcAGATGCTCTCATGAAATATGAGACTATCGACGC ttaaagcttTTACTCATAGCGTTTGTTCCTTTGCAGACAG
pUC118: LAF1336	tttggatccGGGAATTACGATGGAAACCTGGGTCAGTC ttaaagcttTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC
pQE-30: folK	tttggatccACAGTGGCGTATATTGCCATAGG ttaaagcttTTACCATTTGTTAATTTGTCAAATGCTCTGTATG
pMAL-c2x: folK	tttggatccACAGTGGCGTATATTGCCATAGG ttaaagcttTTACCATTTGTTAATTTGTCAAATGCTCTGTATG
pQE-30: LAF1336	tttggatccCTAGCGCAACTGGCCACGGTGGAA ttaaagcttTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC
pMAL-c2x: LAF1336	tttggatccCTAGCGCAACTGGCCACGGTGGAA ttaaagcttTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC
pETDuet-1: LAF1336	tttggatccCTAGCGCAACTGGCCACGGTGGAA ttaaagcttTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC
pQE-30: LAF1336N1	tttggatccCCAACCACCACGGACGCCTTAAACCA ttaaagcttTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC
pMAL-c2x: LAF1336N1	tttggatccCCAACCACCACGGACGCCTTAAACCA ttaaagcttTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC
pQE-30: LAF1336N2	tttggatccGTCAAGCAGGCCGCCTTACCAGTGTT ttaaagcttTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC
pMAL-c2x: LAF1336N2	tttggatccGTCAAGCAGGCCGCCTTACCAGTGTT ttaaagcttTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC
pQE-30: LAF1336N3	tttggatccGTTTACGGGATCTTAAACGTGACGCCGGA ttaaagcttTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC
pMAL-c2x: LAF1336N3	tttggatccGTTTACGGGATCTTAAACGTGACGCCGGA ttaaagcttTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC
pET-NE2150	AGAGAGCTCTAAGAAGGAGATATACATATGAATCATTGCATAACTGAAAGTGAATTCAACG ATAGGATCCTCAGGTGATCGTACTGTCCAGGCCATTC
pUC-NE1434H	ATGGATCCATAATAATTATTTCACTTCTGAAACAGGAGC TTAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGACCACCGTGCAGGGTGGCTGCGGTT
pUC-CT610H	GGAGAATTCTTTGCGCATAGATGAAACAGAGGAC TATAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGACCACCATAGATTGATGACAACTACAACAAGTTCCTGG
pUC-pqqC	AAGAATTCTAAGAAGGAGATATACATATGAGCGACGCACTGCCAATGTCC TATAAGCTTGGTACCTCATAGGGTGATTCCTTTGTGCCACAC

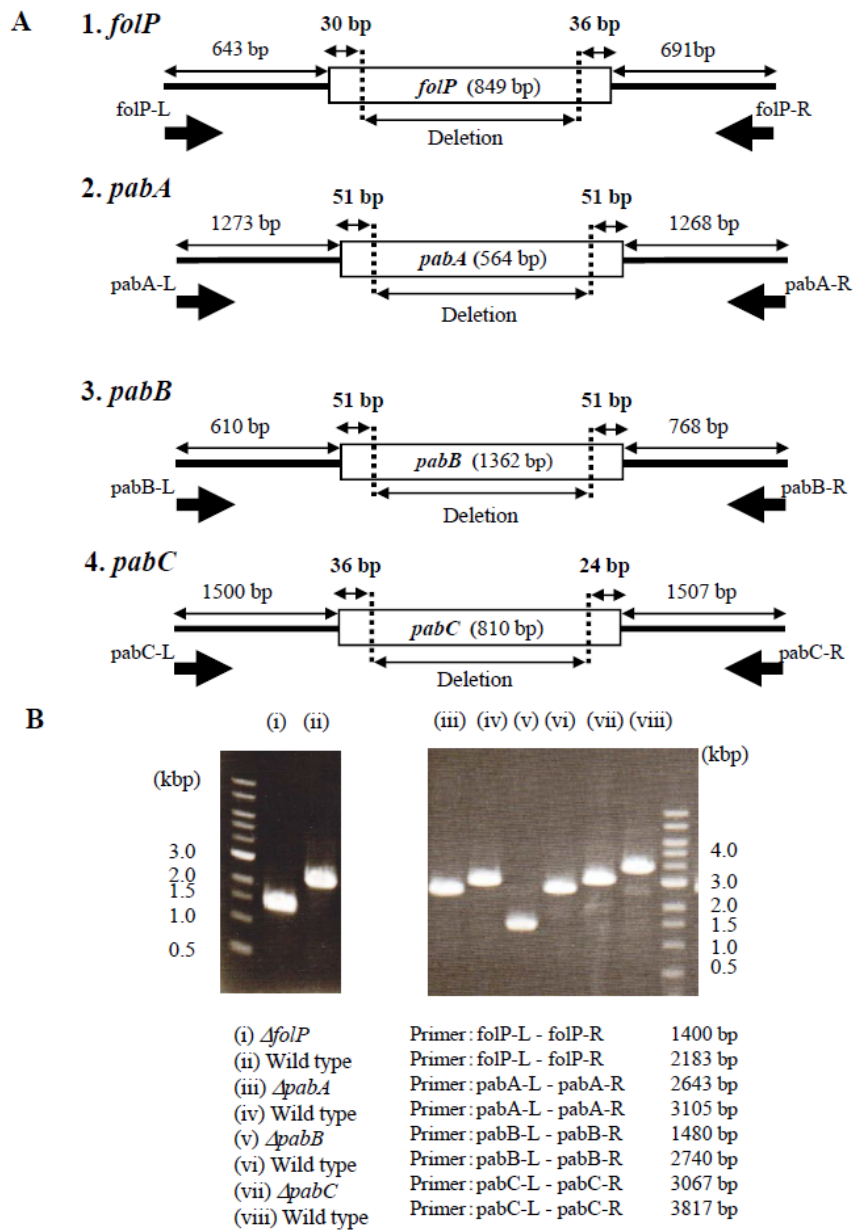
#### *ΔfolP* 株及び *ΔfolP/ΔpabABC* 株の構築

PABA 新規生合成経路の存在を検証するため、*folP* 欠損株 (*ΔfolP* 株)、及び *folP*・*pabA*・*pabB*・*pabC* の四重欠損株 (*ΔfolP/ΔpabABC* 株) を作製した。両変異株は、λ-Red system を使

用し作製した。最初に、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) と *Bacillus subtilis* の sucrase をコードする *sacB* 遺伝子から成る配列を含む、二種類の DNA 断片を取得した。一つは、ターゲット遺伝子上流領域に特異的な配列を含むように設計された L primer と L-CS primer、もう一つは下流領域に特異的な配列を含むように設計された R primer と R-CS primer を使用してそれぞれの領域を増幅させて各 DNA 断片を取得し、それらに加え *cat-sacB* 断片を鋳型として L primer と R primer を用いて fusion PCR を行い、一次組換え用断片を取得した。続いて、pKD46 を有する BW25113 株に対し、アラビノースで組換え酵素を誘導発現させ、先の断片を導入後、クロラムフェニコール耐性かつ sucrose 感受性を示す株 (コロニー) を選抜することで、標的遺伝子領域が *cat-sacB* 配列に置換された一次組換え株を取得した。続いて、標的遺伝子を in-frame で欠失させるための DNA 断片を作製した。これに関しては最初に、標的遺伝子上流及び下流領域を含む DNA 断片を、L primer と RL primer 及び R primer と LR primer を使用して PCR にて増幅させることでそれぞれ取得した。次に、それらの DNA 断片を鋳型として L primer と R primer を使用して fusion PCR を行うことで、二次組換え用断片を取得した。先の一次組換え株に対し、同様にアラビノースで組換え酵素を誘導発現させ、二次組換え用断片を導入後、クロラムフェニコール感受性かつ sucrose 耐性を示す株 (コロニー) を選抜することで、*cat-sacB* 配列領域が標的遺伝子が in-frame で欠失した配列へと置換された二次組換え株を取得した。また、標的遺伝子が破壊されているかどうかの確認は PCR にて行った。なお、*folP* 欠損に関しては、*cat-sacB* 配列が *folP* とその上流遺伝子に当たる *ftsH* の間に挿入されるカセットを作製した。*ΔfolP/ΔpabABC* 株については、*ΔfolP* 破壊株を基に、*pabC*、*pabB*、*pabA* の順に破壊し、それらが想定通り破壊されていることを確認した (Fig. 4-1 (B))。使用した primer 配列を Table 4-2 に示した。

**Table 4-2 Primers used for *ΔfolP* and *ΔfolP/ΔpabABC* mutants**

Target gene		Name	Sequence(5'-3')
<i>pabA</i>	1st step ( <i>cat-sacB</i> cassette)	L	AACAACACTACCTTTCACCGCGTCATTCTT
		L-CS	GTGCTACGCCTGAATAAGTGC GGCCGCctgta gaggttccaggttaaaagaatc gta
		R-CS	CGCAAAAGAAAATGCCGATATGCGGCCGCattcttagcgaacaaggacatcaactgctg
	2nd step (in-frame deletion)	R	GTTGCA TCCCTTCATCGATATCCGCATCTT
		RL	cagcagttgagtctctgttcgtaagaatCTGGTAGAGGTTCCAGGTAAAAGAATCGTA
		LR	TACGATTCTTTTACCTGGAACCTCTACCA Gattcttagcgaacaaggacatcaactgctg
<i>pabB</i>	1st step ( <i>cat-sacB</i> cassette)	L	accaagttc gatgaatgaa gacggcgaa
		L-CS	GTGCTACGCCTGAATAAGTGC GGCCGCagtaatcacagcggagataacgtcttcat
		R-CS	CGCAAAAGAAAATGCCGATATGCGGCCGCaatcgtatcctgaagcaactggagaagtaa
	2nd step (in-frame deletion)	R	cacgataatactcctgacaa ggtgactgga
		RL	ttacttccagttgcttcagatacattAGTAATCACAGCGGGAGATAACGTCTTCAT
		LR	ATGAAGACGTTATCTCCCGCTGTGATTACTa atcgtatcctgaagcaactggagaagtaa
<i>pabC</i>	1st step ( <i>cat-sacB</i> cassette)	L	aatcaccaccgttcaggctgccattga
		L-CS	GTGCTACGCCTGAATAAGTGC GGCCGCcagcgattcctgctataaccgttaataagaacat
		R-CS	CGCAAAAGAAAATGCCGATATGCGGCCGCcaactttgtgagcgccgaattag
	2nd step (in-frame deletion)	R	cgaagactcttctcaatcagatcagct
		RL	TGCTGACGAAAAGGAGACATCGCCc cagtcgcttactgccagcgattc
		LR	gaatcgtcgtggcagtaagc gatcggGGCGATGTCCTTTTCGTGAGCA
<i>folP</i>	1st step ( <i>cat-sacB</i> cassette)	L	aatcaccaccgttcaggctgccattga
		L-CS	GTGCTACGCCTGAATAAGTGC GGCCGCtacgtgaggatgctaa ggtccag
		R-CS	CGCAAAAGAAAATGCCGATATGCGGCCGCgggtgtggaagccactcctg
	2nd step (in-frame deletion)	R	cgaagactcttctcaatcagatcagct
		RL	ttactatagcgtttgtttcctttgacagacagctCAGTGAAGTACCCTGGGCAAGAGTTTCAT
		LR	ATGAAACTCTTTGCCACGGTACTTCACTGactctgtctgcaaa gaaaacaaacgcctatgagtaa



**Fig. 4-1. The *folP*, *pabA*, *pabB*, and *pabC* genes and their flanking regions are shown (A). PCR analysis of the Genomic DNA of the constructed mutants (B).**

**$\Delta pabABC$  株の *aroB*、*aroC*、*aroD* 破壊**

Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Kit (Gene Bridges) を使用し、*aroB*、*aroC*、或いは *aroD* を相同組換えによりカナマイシン耐性遺伝子カセットに置換した。添付プロトコルに従って FLP リコンビナーゼを発現させ、カセット領域を除いた株を作製した。使用 primer を Table 4-3 に示した。

### *ΔpabABC* 株における NE1434 恒常発現株の作製

*E. coli* 染色体上で NE1434 を恒常的に発現させる目的で、*aroB* 破壊等の際と同様に Red/ET recombination system (Gene Bridges) を用いて、NE1434 を *E. coli ΔpabABC* 株の *tnaA* (tryptophanase) 部位に挿入 (置換) した (Fig. 2-12)。使用 primer を Table 4-3 に示した。

**Table 4-3 Primers used for *aroB*, -*C*, and -*D* disruption and NE1434 integration**

Purpose	Primer name	Sequence(5'-3')
<i>aroB</i> disruption and confirmation	PB9	TATATACACTCGTCTGCGGGTACAGTAATTAAGGTGGATGTCGCGTTATG GAATTAACCCCTACTAAAGGGCGGC
	PB10	CTTGATAAGCGGCTGACCTTTCTTGTTGTTACGCTGATTGACAATCGGC AATAATACGACTACTATAGGGCTCG
	PB11	GCGGCTCTGTGAAATCCCGTGAAACG
	PB12	GCTCTACGCGCTCTTCATCCACGGTTTC
<i>aroC</i> disruption and confirmation	PB13	TTATAAAGATTAAGTAAACACGCAAACACAACAATAACGGAGCCGTGA TGGAATTAACCCCTACTAAAGGGCGGC
	PB14	AGCAGCGCAATCGCGTTTTTATTCATTTTTTTACCAGCGTGGAATATCAGT AATACGACTACTATAGGGCTCG
	PB15	GAAGATATGTCCGACCTGCCAAACGAATACC
	PB16	CACCGTACCCATGCCAGATTGCTCAC
<i>aroD</i> disruption and confirmation	PB17	TGGGGTTCGGTGCCTGACAGGCTGACCGCGTGCAGAAAGGGTAAAAAAT GGAATTAACCCCTACTAAAGGGCGGC
	PB18	GGAGGGTGTTCGCCGAAATATTATTGCTTATGCCTGGTGTAAAATAGT TAATACGACTACTATAGGGCTCG
	PB19	CCGACATTTTAACCAATGGCACAAAAGTG
	PB20	GCAGTAATTAACGTGGTGGCTTCCAGAATACC
NE1434 integration and confirmation	PB21	GAATTAACCCCTACTAAAGGGCGGCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGA TTAGC
	PB22	TCAGCGTTACAAGTATAACACAAAGTTTTTTATGTTGTCAATATTTTTTT GATGAGATCTTCCATTCAGGTCGAGGTGGC
	PB23	ATTGACAACATAAAAACTTTGTGTTATACTTGTAACGCTGAATTCCT CTGAACAGGAGCTTTTCATGG
	PB24	TAATACGACTACTATAGGGCTCGACTTATCAGACTTGCAAGGATCAGTG AATATTCACAGGGATCACTGTAATTAATAAATGAAGGATTATGTAA
	PB25	TGGAATTAACCCCTACTAAAGGGCGGC
	PB26	ATCCTTATAGCCACTCTGTAGTATTAATTAACCTTCTTTAAGTTTTGCGG TAATACGACTACTATAGGGCTCG
	PB27	CACCGCCCTTGATTTGCCCTTCTGTAG
	PB28	CCAGGCACCGCAAGATCAACAG

### PABA 要求性相補試験

*E. coli folP* 遺伝子及び *LAF1336* 遺伝子を含む DNA 断片を、以下の primer (*folP*, 5'- TTTGAAT TCAGATGCTCTCATGAAATATGAGACTATCGACGC-3', 5'- TTTAAGCTTTTACTCATAGCGTT TGTTTTCTTTGCAGACAG-3') ; *LAF1336*, 5'- TTTGGATCCGGGAATTTACGATGGAAACCTG GGTCAGTC-3', 5'- TTTAAGCTTTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCG TGTC-3') を用い

て PCR により増幅した。各 DNA 断片のシーケンスを確認した後、*EcoRI-HindIII* 及び *BamHI-HindIII* を利用して pUC118 へクローニングを行うことで、native promoter の制御下で *folP* 及び *LAF1336* を発現する pUC118 : *folP* 及び pUC118 : *LAF1336* をそれぞれ取得した。構築したプラスミドを  $\Delta folP$  株、または  $\Delta folP/\Delta pabABC$  株へ導入し、必要に応じて葉酸や PABA を添加した最少培地 (M9 培地) にてそれらの株の生育を検証した。また、 $\Delta pabABC$  株、 $\Delta pabABC\Delta aroB$  株、 $\Delta pabABC\Delta aroC$  株、 $\Delta pabABC\Delta aroD$  株の PABA 要求性相補を確認する目的で、pUC-NE1434H、pUC-CT610H、pUC-pqqC を導入した株を作製した。各形質転換体を LB プレートで生育させた後、200 mL の滅菌生理食塩水に懸濁し、50 mL 相当分を (PABA 添加或いは非添加の) M9 培地 5 mL へ植菌した。*N. europaea* の培養温度が通常 20~30°C であることを考慮し、生育評価は 30°C で行った。生育は、往復振とう培養用非接触濁時計 (OD-Monitor C&T、TAITEC) を使用して 1 hr のインターバルでモニターした。

### FolK と LAF1336 を用いた酵素アッセイ

*E. coli folK* 遺伝子を、以下の primer (5'-TTTGGATCCACAGTGGCGTATATTGCCATAGG-3', 5'-TTTAAGCTTTTACCATTTGTTTAATTTGTCAAATGCTCTTGTATG -3') を用いて PCR にて増幅した。シーケンス確認後、pQE-30 にクローニングを行うことで pQE-30 : *folK* (FolK の N 末端に 6 × His が付加された融合タンパク質を発現するプラスミド) を取得した。LAF1336 遺伝子についても同様に、以下の primer (5'-TTTGGATCCCCAACCACCACGGACGCCTTTAACC A-3', 5'-TTTAAGCTTTTACAGTTGCCAGTAACCACTGGTAATCGTGTC-3') を用いて PCR にて増幅した DNA 断片をシーケンスにて確認した後、*BamHI-HindIII* を利用して pMAL-c2x へクローニングを行うことで pMAL-c2x : LAF1336 (LAF1336 の N 末端に MBP タグが付加された融合タンパク質を発現するプラスミド) を取得した。それらのプラスミドを用いて His-FolK 及び MBP-LAF1336 を *E. coli* にて発現させ、NTA Agarose resin (QIAGEN) 及び Amylose resin (NEB) にてそれぞれ精製し、それら精製酵素を *in vitro* 酵素アッセイに使用した。反応は、100  $\mu$ l のスケールで行い、5 mM 6-hydroxymethyl-dihydropterin、10 mM ATP、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol、1 mM PABA、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、220  $\mu$ g/mL His-FolK、80  $\mu$ g/mL MBP-LAF1336 の組成で行った。7,8-dihydropteroate の生成は LC、及び LC-MS 解析により確認した。HPLC には、移動相に 20 mM リン酸カリウム (pH 2.5) 及びアセトニトリルを使用し、アセトニトリル濃度を段階的に増加させる条件 (0-5 分、0% ; 6 分、8% ; 15 分、20% ; 16 分、80% ; 17-25 分、0%) で行った。また、カラムには Mightisil RP-18 GP column (250 × 4.6 mm) を使用し、流速 1.5 mL/min、検出波長 210 nm の条件で行った。

### PABA 生合成に関与する遺伝子のショットガンクローニング

*L. fermentum* 及び *N. europaea* のゲノム DNA を *Sau3AI* により部分消化し、アガロース電気泳動で分離した後、凡そ 7 kbp の DNA 断片を精製した。続いて、取得断片を *BamHI* で処理した pSTV29 ベクター (pACYC184 ori, *Plac*, *Cm<sup>r</sup>*; タカラバイオ社) に連結した。Ligation Mixture



を用いて *E. coli*  $\Delta$ *pabABC* 株を形質転換し、M9 プレートで生育するコロニーを選抜した。

### **PABA 生産の検証**

pUC-NE1434H を持つ *E. coli*  $\Delta$ *pabABC* 株を LB 培地 3 mL で 30°C、3 時間培養した後、IPTG を終濃度 0.5 mM となるよう添加し、更に 3 時間培養した。菌体を回収し、等量の M9 培地で洗浄し、アンピシリンと 0.5 mM IPTG を含む M9 培地 3 mL に懸濁し、30°C で更に培養を行った。培養液を 24、48、72 時間のインターバルで回収し、PABA 生産の有無を LC-MS で調べた。解析に際しては、液体クロマトグラフ-質量分析計 (Bruker Daltonics microTOF-HS (Bruker Daltonics)) を備えた Agilent Technologies 1100 series HPLC system (Agilent Technologies) を使用し、培養上清サンプルを以下の条件で解析した。カラム : InertSustain C18 column (150 mm  $\times$  2.1 mm ID  $\times$  3  $\mu$ m ; GL Sciences)、カラム温度 : 35°C、移動相 : 0.1% (v/v) ギ酸を含む 5% アセトニトリル溶液、流速 : 0.2 mL/min。PABA は凡そ 10 分で溶出され、 $m/z=138.056 \pm 0.010$  (ラベル化されていない PABA) 及び  $145.079 \pm 0.010$  ( $^{13}\text{C}$  でラベル化された PABA) として検出された。

### **『第 3 章』**

本項の内容は、共著論文として学術雑誌に掲載されており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため公表できない。本章の内容は、ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY Vol.55, No.2, pp.913-916 に掲載されている。

## 参考文献

1. Adams, N. E.; Thiaville, J. J.; Proestos, J.; Juárez-Vázquez, A. L.; McCoy, A. J.; Barona-Gómez, F.; Iwata-Reuyl, D.; de Crécy-Lagard, V.; Maurelli, A. T., Promiscuous and adaptable enzymes fill "holes" in the tetrahydrofolate pathway in *Chlamydia* species. *MBio* **2014**, *5* (4), e01378-14.
2. Altermann, E.; Russell, W. M.; Azcarate-Peril, M. A.; Barrangou, R.; Buck, B. L.; McAuliffe, O.; Souther, N.; Dobson, A.; Duong, T.; Callanan, M.; Lick, S.; Hamrick, A.; Cano, R.; Klaenhammer, T. R., Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (11), 3906-12.
3. Karen S. A.; Warren M. K.; Qi Zhuang Y.; Jun L.; Christopher T. W.; Alan J. B.; Kenneth A. J., Isolation and structure elucidation of the 4-amino-4-deoxychorismate intermediate in the PABA enzymatic pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3198-3200.
4. Arai, R.; Murayama, K.; Uchikubo-Kamo, T.; Nishimoto, M.; Toyama, M.; Kuramitsu, S.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S., Crystal structure of MqnD (TTHA1568), a menaquinone biosynthetic enzyme from *Thermus thermophilus* HB8. *J Struct Biol* **2009**, *168* (3), 575-81.
5. Arakawa, C.; Kuratsu, M.; Furihata, K.; Hiratsuka, T.; Itoh, N.; Seto, H.; Dairi, T., Diversity of the early step of the futasoline pathway. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55* (2), 913-6.
6. Azcarate-Peril, M. A.; Altermann, E.; Goh, Y. J.; Tallon, R.; Sanozky-Dawes, R. B.; Pfeiler, E. A.; O'Flaherty, S.; Buck, B. L.; Dobson, A.; Duong, T.; Miller, M. J.; Barrangou, R.; Klaenhammer, T. R., Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism. *Appl Environ Microbiol* **2008**, *74* (15), 4610-25.
7. Azcarate-Peril, M. A.; McAuliffe, O.; Altermann, E.; Lick, S.; Russell, W. M.; Klaenhammer, T. R., Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71* (10), 5794-804.
8. Baba, T.; Ara, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Okumura, Y.; Baba, M.; Datsenko, K. A.; Tomita, M.; Wanner, B. L.; Mori, H., Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2006**, *2*, 2006.0008.
9. Barabote, R. D.; Xie, G.; Leu, D. H.; Normand, P.; Necsulea, A.; Daubin, V.; Médigue, C.; Adney, W. S.; Xu, X. C.; Lapidus, A.; Parales, R. E.; Detter, C.; Pujic, P.; Bruce, D.; Lavire, C.; Challacombe, J. F.; Brettin, T. S.;

- Berry, A. M., Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Res* **2009**, *19* (6), 1033-43.
10. Barrangou, R.; Azcarate-Peril, M. A.; Duong, T.; Conners, S. B.; Kelly, R. M.; Klaenhammer, T. R., Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (10), 3816-21.
11. Begley, T. P., Cofactor biosynthesis: an organic chemist's treasure trove. *Nat Prod Rep* **2006**, *23* (1), 15-25.
12. Bentley, R.; Meganathan, R., Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev* **1982**, *46* (3), 241-80.
13. Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeño-Tárraga, A. M.; Challis, G. L.; Thomson, N. R.; James, K. D.; Harris, D. E.; Quail, M. A.; Kieser, H.; Harper, D.; Bateman, A.; Brown, S.; Chandra, G.; Chen, C. W.; Collins, M.; Cronin, A.; Fraser, A.; Goble, A.; Hidalgo, J.; Hornsby, T.; Howarth, S.; Huang, C. H.; Kieser, T.; Larke, L.; Murphy, L.; Oliver, K.; O'Neil, S.; Rabinowitsch, E.; Rajandream, M. A.; Rutherford, K.; Rutter, S.; Seeger, K.; Saunders, D.; Sharp, S.; Squares, R.; Squares, S.; Taylor, K.; Warren, T.; Wietzorrek, A.; Woodward, J.; Barrell, B. G.; Parkhill, J.; Hopwood, D. A., Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **2002**, *417* (6885), 141-7.
14. Bermingham, A.; Derrick, J. P., The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *Bioessays* **2002**, *24* (7), 637-48.
15. Bolotin, A.; Quinquis, B.; Renault, P.; Sorokin, A.; Ehrlich, S. D.; Kulakauskas, S.; Lapidus, A.; Goltsman, E.; Mazur, M.; Pusch, G. D.; Fonstein, M.; Overbeek, R.; Kyprides, N.; Purnelle, B.; Prozzi, D.; Ngui, K.; Masuy, D.; Hancy, F.; Burteau, S.; Boutry, M.; Delcour, J.; Goffeau, A.; Hols, P., Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* **2004**, *22* (12), 1554-8.
16. Bolotin, A.; Wincker, P.; Mauger, S.; Jaillon, O.; Malmme, K.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S. D.; Sorokin, A., The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* **2001**, *11* (5), 731-53.
17. Callanan, M.; Kaleta, P.; O'Callaghan, J.; O'Sullivan, O.; Jordan, K.; McAuliffe, O.; Sangrador-Vegas, A.; Slattery, L.; Fitzgerald, G. F.; Beresford, T.; Ross, R. P., Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J Bacteriol* **2008**, *190* (2), 727-35.

18. Chaillou, S.; Champomier-Vergès, M. C.; Cornet, M.; Crutz-Le Coq, A. M.; Dudez, A. M.; Martin, V.; Beaufils, S.; Darbon-Rongère, E.; Bossy, R.; Loux, V.; Zagorec, M., The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat Biotechnol* **2005**, *23* (12), 1527-33.
19. Chervaux, C.; Ehrlich, S. D.; Maguin, E., Physiological study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in a novel chemically defined medium. *Appl Environ Microbiol* **2000**, *66* (12), 5306-11.
20. Chiba, Y.; Oshima, K.; Arai, H.; Ishii, M.; Igarashi, Y., Discovery and analysis of cofactor-dependent phosphoglycerate mutase homologs as novel phosphoserine phosphatases in *Hydrogenobacter thermophilus*. *J Biol Chem* **2012**, *287* (15), 11934-41.
21. Christiansen, J. K.; Hughes, J. E.; Welker, D. L.; Rodríguez, B. T.; Steele, J. L.; Broadbent, J. R., Phenotypic and genotypic analysis of amino acid auxotrophy in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Appl Environ Microbiol* **2008**, *74* (2), 416-23.
22. Claesson, M. J.; Li, Y.; Leahy, S.; Canchaya, C.; van Pijkeren, J. P.; Cerdeño-Tárraga, A. M.; Parkhill, J.; Flynn, S.; O'Sullivan, G. C.; Collins, J. K.; Higgins, D.; Shanahan, F.; Fitzgerald, G. F.; van Sinderen, D.; O'Toole, P. W., Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (17), 6718-23.
23. Cooper, L. E.; Fedoseyenko, D.; Abdelwahed, S. H.; Kim, S. H.; Dairi, T.; Begley, T. P., In vitro reconstitution of the radical S-adenosylmethionine enzyme MqnC involved in the biosynthesis of fufalosine-derived menaquinone. *Biochemistry* **2013**, *52* (27), 4592-4.
24. Cranenburg, E. C.; Schurgers, L. J.; Vermeer, C., Vitamin K: the coagulation vitamin that became omnipotent. *Thromb Haemost* **2007**, *98* (1), 120-5.
25. Feist, A. M.; Henry, C. S.; Reed, J. L.; Krummenacker, M.; Joyce, A. R.; Karp, P. D.; Broadbelt, L. J.; Hatzimanikatis, V.; Palsson, B., A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol Syst Biol* **2007**, *3*, 121.
26. Forde, B. M.; Neville, B. A.; O'Donnell, M. M.; Riboulet-Bisson, E.; Claesson, M. J.; Coghlan, A.; Ross, R. P.; O'Toole, P. W., Genome sequences and comparative genomics of two *Lactobacillus ruminis* strains from the bovine and human intestinal tracts. *Microb Cell Fact* **2011**, *10 Suppl 1*, S13.
27. Goncharoff, P.; Nichols, B. P., Nucleotide sequence of *Escherichia coli* *pabB* indicates a common evolutionary origin of p-aminobenzoate synthetase and anthranilate synthetase. *J Bacteriol* **1984**, *159* (1), 57-62.

28. Green, J. M.; Merkel, W. K.; Nichols, B. P., Characterization and sequence of Escherichia coli pabC, the gene encoding aminodeoxychorismate lyase, a pyridoxal phosphate-containing enzyme. *J Bacteriol* **1992**, *174* (16), 5317-23.
29. Green, J. M.; Nichols, B. P., p-Aminobenzoate biosynthesis in Escherichia coli. Purification of aminodeoxychorismate lyase and cloning of pabC. *J Biol Chem* **1991**, *266* (20), 12971-5.
30. Grobben, G. J.; Chin-Joe, I.; Kitzen, V. A.; Boels, I. C.; Boer, F.; Sikkema, J.; Smith, M. R.; de Bont, J. A., Enhancement of Exopolysaccharide Production by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus NCFB 2772 with a Simplified Defined Medium. *Appl Environ Microbiol* **1998**, *64* (4), 1333-7.
31. Hayashi, Y.; Onaka, H.; Itoh, N.; Seto, H.; Dairi, T., Cloning of the gene cluster responsible for biosynthesis of KS-505a (longestin), a unique tetraterpenoid. *Biosci Biotechnol Biochem* **2007**, *71* (12), 3072-81.
32. He, Z.; Stigers Lavoie, K. D.; Bartlett, P. A.; Toney, M. D., Conservation of mechanism in three chorismate-utilizing enzymes. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (8), 2378-85.
33. Henne, A.; Brüggemann, H.; Raasch, C.; Wiezer, A.; Hartsch, T.; Liesegang, H.; Johann, A.; Lienard, T.; Gohl, O.; Martinez-Arias, R.; Jacobi, C.; Starkuviene, V.; Schlenczeck, S.; Dencker, S.; Huber, R.; Klenk, H. P.; Kramer, W.; Merkl, R.; Gottschalk, G.; Fritz, H. J., The genome sequence of the extreme thermophile Thermus thermophilus. *Nat Biotechnol* **2004**, *22* (5), 547-53.
34. Hiratsuka, T.; Furihata, K.; Ishikawa, J.; Yamashita, H.; Itoh, N.; Seto, H.; Dairi, T., An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms. *Science* **2008**, *321* (5896), 1670-3.
35. Hiratsuka, T.; Itoh, N.; Seto, H.; Dairi, T., Enzymatic properties of futasine hydrolase, an enzyme essential to a newly identified menaquinone biosynthetic pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* **2009**, *73* (5), 1137-41.
36. Huang, M.; Gibson, F., Biosynthesis of 4-aminobenzoate in Escherichia coli. *J Bacteriol* **1970**, *102* (3), 767-73.
37. Huang, M.; Pittard, J., Genetic analysis of mutant strains of Escherichia coli requiring p-aminobenzoic acid for growth. *J Bacteriol* **1967**, *93* (6), 1938-42.
38. Jhee, K. H.; Yoshimura, T.; Miles, E. W.; Takeda, S.; Miyahara, I.; Hirotsu, K.; Soda, K.; Kawata, Y.; Esaki, N., Stereochemistry of the transamination reaction catalyzed by aminodeoxychorismate lyase from Escherichia coli: close relationship between fold type and stereochemistry. *J Biochem* **2000**, *128* (4), 679-86.

39. Jiménez, E.; Martín, R.; Maldonado, A.; Martín, V.; Gómez de Segura, A.; Fernández, L.; Rodríguez, J. M., Complete genome sequence of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces. *J Bacteriol* **2010**, *192* (19), 5266-7.
40. Joyce, A. R.; Reed, J. L.; White, A.; Edwards, R.; Osterman, A.; Baba, T.; Mori, H.; Lesely, S. A.; Palsson, B.; Agarwalla, S., Experimental and computational assessment of conditionally essential genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **2006**, *188* (23), 8259-71.
41. Kant, R.; Paulin, L.; Alatalo, E.; de Vos, W. M.; Palva, A., Genome sequence of *Lactobacillus amylovorus* GRL1112. *J Bacteriol* **2011**, *193* (3), 789-90.
42. Kant, R.; Paulin, L.; Alatalo, E.; de Vos, W. M.; Palva, A., Genome sequence of *Lactobacillus amylovorus* GRL1118, isolated from pig ileum. *J Bacteriol* **2011**, *193* (12), 3147-8.
43. Klaenhammer, T. R.; Barrangou, R.; Buck, B. L.; Azcarate-Peril, M. A.; Altermann, E., Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev* **2005**, *29* (3), 393-409.
44. Kleerebezem, M.; Boekhorst, J.; van Kranenburg, R.; Molenaar, D.; Kuipers, O. P.; Leer, R.; Turchini, R.; Peters, S. A.; Sandbrink, H. M.; Fiers, M. W.; Stiekema, W.; Lankhorst, R. M.; Bron, P. A.; Hoffer, S. M.; Groot, M. N.; Kerkhoven, R.; de Vries, M.; Ursing, B.; de Vos, W. M.; Siezen, R. J., Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (4), 1990-5.
45. Kuratsu, M.; Hamano, Y.; Dairi, T., Analysis of the *Lactobacillus* metabolic pathway. *Appl Environ Microbiol* **2010**, *76* (21), 7299-301.
46. Ledesma, O. V.; De Ruiz Holgado, A. P.; Oliver, G.; De Giori, G. S.; Raibaud, P.; Galpin, J. V., A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* **1977**, *42* (1), 123-33.
47. Lima, W. C.; Varani, A. M.; Menck, C. F., NAD biosynthesis evolution in bacteria: lateral gene transfer of kynurenine pathway in Xanthomonadales and Flavobacteriales. *Mol Biol Evol* **2009**, *26* (2), 399-406.
48. Liu, S.; Leathers, T. D.; Copeland, A.; Chertkov, O.; Goodwin, L.; Mills, D. A., Complete genome sequence of *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929, a novel strain from a commercial ethanol plant. *J Bacteriol* **2011**, *193* (15), 4019-20.
49. Mahanta, N.; Fedoseyenko, D.; Dairi, T.; Begley, T. P., Menaquinone biosynthesis: formation of aminofutalosine requires a unique radical SAM enzyme. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (41), 15318-21.

50. Makarova, K.; Slesarev, A.; Wolf, Y.; Sorokin, A.; Mirkin, B.; Koonin, E.; Pavlov, A.; Pavlova, N.; Karamychev, V.; Polouchine, N.; Shakhova, V.; Grigoriev, I.; Lou, Y.; Rohksar, D.; Lucas, S.; Huang, K.; Goodstein, D. M.; Hawkins, T.; Plengvidhya, V.; Welker, D.; Hughes, J.; Goh, Y.; Benson, A.; Baldwin, K.; Lee, J. H.; Díaz-Muñiz, I.; Dosti, B.; Smeianov, V.; Wechter, W.; Barabote, R.; Lorca, G.; Altermann, E.; Barrangou, R.; Ganesan, B.; Xie, Y.; Rawsthorne, H.; Tamir, D.; Parker, C.; Breidt, F.; Broadbent, J.; Hutkins, R.; O'Sullivan, D.; Steele, J.; Unlu, G.; Saier, M.; Klaenhammer, T.; Richardson, P.; Kozyavkin, S.; Weimer, B.; Mills, D., Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (42), 15611-6.
51. Meganathan, R., Biosynthesis of menaquinone (vitamin K<sub>2</sub>) and ubiquinone (coenzyme Q): a perspective on enzymatic mechanisms. *Vitam Horm* **2001**, *61*, 173-218.
52. Morar, M.; White, R. H.; Ealick, S. E., Structure of 2-amino-3,7-dideoxy-D-threo-hept-6-ulosonic acid synthase, a catalyst in the archaeal pathway for the biosynthesis of aromatic amino acids. *Biochemistry* **2007**, *46* (37), 10562-71.
53. Morita, H.; Toh, H.; Fukuda, S.; Horikawa, H.; Oshima, K.; Suzuki, T.; Murakami, M.; Hisamatsu, S.; Kato, Y.; Takizawa, T.; Fukuoka, H.; Yoshimura, T.; Itoh, K.; O'Sullivan, D. J.; McKay, L. L.; Ohno, H.; Kikuchi, J.; Masaoka, T.; Hattori, M., Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res* **2008**, *15* (3), 151-61.
54. Morita, H.; Toh, H.; Oshima, K.; Murakami, M.; Taylor, T. D.; Igimi, S.; Hattori, M., Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *J Bacteriol* **2009**, *191* (24), 7630-1.
55. Morita, H.; Toh, H., Genomics of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Intestinal Microbiology* **2007**, *21* (3), 209-215.
56. Nakanishi, S.; Osawa, K.; Saito, Y.; Kawamoto, I.; Kuroda, K.; Kase, H., KS-505a, a novel inhibitor of bovine brain Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase from *Streptomyces argenteolus*. *J Antibiot (Tokyo)* **1992**, *45* (3), 341-7.
57. Nelson, K. E.; Weinel, C.; Paulsen, I. T.; Dodson, R. J.; Hilbert, H.; Martins dos Santos, V. A.; Fouts, D. E.; Gill, S. R.; Pop, M.; Holmes, M.; Brinkac, L.; Beanan, M.; DeBoy, R. T.; Daugherty, S.; Kolonay, J.; Madupu, R.; Nelson, W.; White, O.; Peterson, J.; Khouri, H.; Hance, I.; Chris Lee, P.; Holtzapple, E.; Scanlan, D.; Tran, K.; Moazzez, A.; Utterback, T.; Rizzo, M.; Lee, K.; Kosack, D.; Moestl, D.; Wedler, H.; Lauber, J.; Stjepandic, D.; Hoheisel, J.; Straetz, M.; Heim, S.; Kiewitz, C.; Eisen, J. A.; Timmis, K. N.; Dusterhöft, A.; Tümmler, B.; Fraser, C. M., Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **2002**, *4* (12), 799-808.

58. Nichols, B. P.; Seibold, A. M.; Doktor, S. Z., para-aminobenzoate synthesis from chorismate occurs in two steps. *J Biol Chem* **1989**, *264* (15), 8597-601.
59. Nishiyama, M., [Novel lysine biosynthesis: a key to elucidate evolution of metabolic and biosynthetic pathways]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **2004**, *49* (6), 758-63.
60. Ojala, T.; Kuparinen, V.; Koskinen, J. P.; Alatalo, E.; Holm, L.; Auvinen, P.; Edelman, S.; Westerlund-Wikström, B.; Korhonen, T. K.; Paulin, L.; Kankainen, M., Genome sequence of *Lactobacillus crispatus* ST1. *J Bacteriol* **2010**, *192* (13), 3547-8.
61. Omura, S.; Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Takahashi, C.; Shinose, M.; Takahashi, Y.; Horikawa, H.; Nakazawa, H.; Osonoe, T.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M., Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (21), 12215-20.
62. Padmanabhan, B.; Bessho, Y.; Ebihara, A.; Antonyuk, S. V.; Ellis, M. J.; Strange, R. W.; Kuramitsu, S.; Watanabe, N.; Hasnain, S. S.; Yokoyama, S., Structure of putative 4-amino-4-deoxychorismate lyase from *Thermus thermophilus* HB8. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **2009**, *65* (Pt 12), 1234-9.
63. Parkhill, J.; Wren, B. W.; Mungall, K.; Ketley, J. M.; Churcher, C.; Basham, D.; Chillingworth, T.; Davies, R. M.; Feltwell, T.; Holroyd, S.; Jagels, K.; Karlyshev, A. V.; Moule, S.; Pallen, M. J.; Penn, C. W.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rutherford, K. M.; van Vliet, A. H.; Whitehead, S.; Barrell, B. G., The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* **2000**, *403* (6770), 665-8.
64. Parsons, J. F.; Jensen, P. Y.; Pachikara, A. S.; Howard, A. J.; Eisenstein, E.; Ladner, J. E., Structure of *Escherichia coli* aminodeoxychorismate synthase: architectural conservation and diversity in chorismate-utilizing enzymes. *Biochemistry* **2002**, *41* (7), 2198-208.
65. Patrick, W. M.; Quandt, E. M.; Swartzlander, D. B.; Matsumura, I., Multicopy suppression underpins metabolic evolvability. *Mol Biol Evol* **2007**, *24* (12), 2716-22.
66. Pfeiler, E. A.; Azcarate-Peril, M. A.; Klaenhammer, T. R., Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *J Bacteriol* **2007**, *189* (13), 4624-34.
67. Pieterse, B.; Leer, R. J.; Schuren, F. H.; van der Werf, M. J., Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology* **2005**, *151* (Pt 12), 3881-94.



68. Plamann, M. D.; Stauffer, G. V., Escherichia coli glyA mRNA decay: the role of 3' secondary structure and the effects of the pnp and rnb mutations. *Mol Gen Genet* **1990**, *220* (2), 301-6.
69. Porat, I.; M, S.-L.; Q, T.; FJ, B.; RH, W.; WB, W., Biochemical and genetic characterization of an early step in a novel pathway for the biosynthesis of aromatic amino acids and p-aminobenzoic acid in the archaeon Methanococcus maripaludis. *Mol Microbiol.* **2006**, *62*, 1117-31.
70. Porat, I.; Waters, B. W.; Teng, Q.; Whitman, W. B., Two biosynthetic pathways for aromatic amino acids in the archaeon Methanococcus maripaludis. *J Bacteriol* **2004**, *186* (15), 4940-50.
71. Pridmore, R. D.; Berger, B.; Desiere, F.; Vilanova, D.; Barretto, C.; Pittet, A. C.; Zwahlen, M. C.; Rouvet, M.; Altermann, E.; Barrangou, R.; Mollet, B.; Mercenier, A.; Klaenhammer, T.; Arigoni, F.; Schell, M. A., The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium Lactobacillus johnsonii NCC 533. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (8), 2512-7.
72. Samland, A. K.; Wang, M.; Sprenger, G. A., MJ0400 from Methanocaldococcus jannaschii exhibits fructose-1,6-bisphosphate aldolase activity. *FEMS Microbiol Lett* **2008**, *281* (1), 36-41.
73. Santos, F.; Teusink, B.; Molenaar, D.; van Heck, M.; Wels, M.; Sieuwerts, S.; de Vos, W. M.; Hugenholtz, J., Effect of amino acid availability on vitamin B12 production in Lactobacillus reuteri. *Appl Environ Microbiol* **2009**, *75* (12), 3930-6.
74. Satoh, Y.; Kuratsu, M.; Kobayashi, D.; Dairi, T., New gene responsible for para-aminobenzoate biosynthesis. *J Biosci Bioeng* **2014**, *117* (2), 178-83.
75. Satoh, Y.; Tajima, K.; Munekata, M.; Keasling, J. D.; Lee, T. S., Engineering of a tyrosol-producing pathway, utilizing simple sugar and the central metabolic tyrosine, in Escherichia coli. *J Agric Food Chem* **2012**, *60* (4), 979-84.
76. Schwarzenbacher, R.; Stenner-Liewen, F.; Liewen, H.; Robinson, H.; Yuan, H.; Bossy-Wetzel, E.; Reed, J. C.; Liddington, R. C., Structure of the Chlamydia protein CADD reveals a redox enzyme that modulates host cell apoptosis. *J Biol Chem* **2004**, *279* (28), 29320-4.
77. Seto, H.; Jinnai, Y.; Hiratsuka, T.; Fukawa, M.; Furihata, K.; Itoh, N.; Dairi, T., Studies on a new biosynthetic pathway for menaquinone. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (17), 5614-5.
78. Shen, Y. Q.; Bonnot, F.; Imsand, E. M.; RoseFigura, J. M.; Sjölander, K.; Klinman, J. P., Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone. *Biochemistry* **2012**, *51* (11), 2265-75.

79. Siezen, R. J.; Francke, C.; Renckens, B.; Boekhorst, J.; Wels, M.; Kleerebezem, M.; van Hijum, S. A., Complete resequencing and reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 genome. *J Bacteriol* **2012**, *194* (1), 195-6.
80. Stephens, R. S.; Kalman, S.; Lammel, C.; Fan, J.; Marathe, R.; Aravind, L.; Mitchell, W.; Olinger, L.; Tatusov, R. L.; Zhao, Q.; Koonin, E. V.; Davis, R. W., Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* **1998**, *282* (5389), 754-9.
81. Takagi, M.; Kuzuyama, T.; Seto, H., [Overlooked targets for the development of antibacterial and antimalarial drugs and herbicides: diverse biosynthetic systems for the isoprene units]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **2002**, *47* (1), 58-65.
82. Takahashi, Y.; Wada, K.; Fukuyama, K., [Biogenesis of iron-sulfur clusters mediated by complex machineries]. *Seikagaku* **2010**, *82* (2), 139-43.
83. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S., MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **2011**, *28* (10), 2731-9.
84. Teusink, B.; van Enckevort, F. H.; Francke, C.; Wiersma, A.; Wegkamp, A.; Smid, E. J.; Siezen, R. J., In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments. *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71* (11), 7253-62.
85. Tomb, J. F.; White, O.; Kerlavage, A. R.; Clayton, R. A.; Sutton, G. G.; Fleischmann, R. D.; Ketchum, K. A.; Klenk, H. P.; Gill, S.; Dougherty, B. A.; Nelson, K.; Quackenbush, J.; Zhou, L.; Kirkness, E. F.; Peterson, S.; Loftus, B.; Richardson, D.; Dodson, R.; Khalak, H. G.; Glodek, A.; McKenney, K.; Fitzegerald, L. M.; Lee, N.; Adams, M. D.; Hickey, E. K.; Berg, D. E.; Gocayne, J. D.; Utterback, T. R.; Peterson, J. D.; Kelley, J. M.; Cotton, M. D.; Weidman, J. M.; Fujii, C.; Bowman, C.; Watthey, L.; Wallin, E.; Hayes, W. S.; Borodovsky, M.; Karp, P. D.; Smith, H. O.; Fraser, C. M.; Venter, J. C., The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **1997**, *388* (6642), 539-47.
86. Tompkins, T. A.; Barreau, G.; Broadbent, J. R., Complete genome sequence of *Lactobacillus helveticus* R0052, a commercial probiotic strain. *J Bacteriol* **2012**, *194* (22), 6349.
87. van de Guchte, M.; Penaud, S.; Grimaldi, C.; Barbe, V.; Bryson, K.; Nicolas, P.; Robert, C.; Oztas, S.; Mangenot, S.; Couloux, A.; Loux, V.; Dervyn, R.; Bossy, R.; Bolotin, A.; Batto, J. M.; Walunas, T.; Gibrat, J. F.; Bessières, P.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S. D.; Maguin, E., The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (24), 9274-9.

88. Vogel, R. F.; Pavlovic, M.; Ehrmann, M. A.; Wiezer, A.; Liesegang, H.; Offschanka, S.; Voget, S.; Angelov, A.; Böcker, G.; Liebl, W., Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microb Cell Fact* **2011**, *10 Suppl 1*, S6.
89. Wang, Y.; Wang, J.; Ahmed, Z.; Bai, X., Complete genome sequence of *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3. *J Bacteriol* **2011**, *193* (16), 4280-1.
90. Wegmann, U.; O'Connell-Motherway, M.; Zomer, A.; Buist, G.; Shearman, C.; Canchaya, C.; Ventura, M.; Goesmann, A.; Gasson, M. J.; Kuipers, O. P.; van Sinderen, D.; Kok, J., Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol* **2007**, *189* (8), 3256-70.
91. White, R. H., L-Aspartate semialdehyde and a 6-deoxy-5-ketohexose 1-phosphate are the precursors to the aromatic amino acids in *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochemistry* **2004**, *43* (23), 7618-27.
92. White, R. H.; Xu, H., Methylglyoxal is an intermediate in the biosynthesis of 6-deoxy-5-ketofructose-1-phosphate: a precursor for aromatic amino acid biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochemistry* **2006**, *45* (40), 12366-79.
93. Ye, Q. Z.; Liu, J.; Walsh, C. T., p-Aminobenzoate synthesis in *Escherichia coli*: purification and characterization of PabB as aminodeoxychorismate synthase and enzyme X as aminodeoxychorismate lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87* (23), 9391-5.
94. 山本裕司; 神尾好是, 乳酸菌における酸素分子の利用と毒性. *蛋白質 核酸 酵素* **2001**, *46* (6), 726-732.

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、多大なるご支援とご指導を賜りました、北海道大学 大学院工学研究院 生物機能高分子部門 応用生物化学研究室の大利徹教授に深く感謝致します。富山県立大学へ派遣された1年間、またその後4年間に渡り、私の学位取得に向け並々ならぬご尽力を頂いたこと、また至らない私を最後まで啓発激励下さったことで、ここまで辿りつくことができたと感じております。一言で感謝の気持ちをお伝えするには全く不十分で恐縮ですが、数々のご厚意を本当に深謝いたします。学位の取得にあたり、主査をご快諾頂きました東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物学研究室 北本勝ひこ教授に深く感謝いたします。修士課程の2年間に終始懇切かつ親愛なるご指導、ご鞭撻を賜ったことに飽き足らず、このたびの学位論文でもご多忙の中貴重な時間を割いて頂き、数々のご助言を賜りましたこと、先生の温かいご支援を深く深く感謝しております。

PABA の研究での多大なるご支援を賜りました北海道大学 大学院工学研究院 生物機能高分子部門 応用生物化学研究室の佐藤康治助教に深く感謝いたします。先生のお力添えなくしては、PABA の研究の前進はありませんでした。本当にありがとうございました。メナキノン新規経路の研究においては、酵素アッセイの基礎からご支援、ご指導を賜りました中野千里様（旧姓：荒川）に深く御礼申し上げます。富山県立大学でスムーズに研究が進められたことは、貴殿の存在があつてこそのものでした。深く感謝いたします。futalosine や Aminodeoxyfutalosine の合成に多大なるご支援を頂きました故瀬戸治夫博士に謹んで感謝申し上げます。富山県立大学への派遣期間、本研究に対する温かいご支援を賜りました富山県立大学 工学部 生物工学科 応用生物プロセス学講座 伊藤伸哉教授に深謝いたします。LC-MS 解析において多くのご支援を頂きました福井県立大学 生物資源学部 生物資源学科 濱野吉十准教授に深く感謝しております。Aminodeoxyfutalosine の構造解析について多くのご支援を頂きました東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 生物生産化学講座 降旗一夫先生に深く感謝しております。メナキノン新規経路の研究において、多くの有益な情報や実験材料を賜りました理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルゲノミクス研究グループ 平塚知成博士に深く感謝いたします。

本研究にあたり、その発端をご提供下さり終始温かいご支援を賜りました協和発酵バイオ株式会社 橋本信一部長、矢ヶ崎誠部長に深謝いたします。また、学位取得に向けて多くのご支援を賜りました協和発酵バイオ株式会社 BIOKYOWA 小川達也社長、生産技術研究所 安原昭典所長、同 阿部哲也主任研究員、同 足立雄悟主任研究員に深く感謝申し上げます。

最後に、常に温かく見守り励まして下さった両親に深謝の意を表して謝辞といたします。