

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510189

研究課題名（和文） ゲノム情報に基づくビフィズス菌の革新的遺伝子操作技術の開発

研究課題名（英文） Development of innovative genetic manipulation methods of *Bifidobacterium* based on the genome information.

研究代表者

鈴木 徹 (SUZUKI TOHRU)

岐阜大学・連合農学研究科・教授

研究者番号：20235972

研究成果の概要（和文）：ビフィズス菌は、ヒトの健康にとって重要な役割をはたしていると考えられているが、そのエビデンスは必ずしも多くない。これは、本菌の遺伝子操作技術が開発されていない事に起因する。本研究では、ビフィズスのゲノム解析の結果に基づき新規形質転換系、新規選択マーカー、及び遺伝子破壊系の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Bifidobacteria are thought to be important bacteria for human health. However, the scientific evidences has not yet obtained because it has been difficult to manipulate the gene. In this study, we developed new transformation method, selection marker and gene knock-out method based on the genome analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ゲノム微生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：形質転換、プラスミド人工修飾法、PAM、遺伝子破壊、*Bifidobacterium adolescentis*、相同組換え、逆遺伝学、*Bifidobacterium longum*、

## 1. 研究開始当初の背景

ビフィズス菌は、便秘の緩和、悪玉菌の抑制、免疫賦活、アレルギー症状の緩和など様々な健康への効果が注目されている。しかし有効な遺伝子操作系が開発されていなかったことから、あまり生理的、生化学的な研究や、遺伝学的な研究が行われてきていない。

## 2. 研究の目的

我々がこれまでに決定した成人腸管で最も優勢な *B. adolescentis* の全ゲノム配列に基づき、ビフィズス菌属細菌の1)形質転換効率を画期的に上げる方法の開発、2)安定な選択マーカーの確立、3)相同組み換えによる遺伝子

破壊法の開発、4)酸素耐性の付与といった各種の遺伝子操作の方法を開発し、本菌属における遺伝子操作を、大腸菌と同程度に簡便化することを目的とする。

## 3. 研究の方法及び結果

3-1 プラスミド人工修飾法を用いた形質転換効率の向上

## 3-1-1. 研究の方法

*B. adolescentis* のゲノム情報に基づき、本菌の制限修飾系の遺伝子を抽出し、大腸菌内にこれらを発現させる事により、シャトルベクタープラスミドを人工的に修飾させること

により、形質転換効率を上昇させる PAM 法 (Plasmid Artificial Modification 法を考案した)。また、ビフィズス菌のプラスミドをエラープロン PCR 法で変異させ、温度感受性変異シャトルベクターを構築した。

### 3-1-2. 研究成果

*B. adolescentis* に PAM 法を適応したところ、形質転換効率が  $10^5$  倍上昇した。また、温度感受性シャトルベクターの取得に成功し、相同組み換えによる遺伝子破壊法が確立された。

### 3-2 温度感受性プラスミドの所得

#### 3-2-1. 研究の目的

ビフィズス菌の効率的な相同組み換え系については未だ構築されていない。本研究ではビフィズス菌において、より効率的な遺伝子破壊法を構築することを目的とした。この目的を達成するために相同組み換えに有効なツールとなり得る温度感受性プラスミドの構築を行った。

#### 3-2-2. 研究方法

1) ビフィズス菌における温度感受性 (temperature sensitive, TS) プラスミドを取得するために、プラスミド複製に関与する pTB6 領域を標的にして PCR 法に基づいた遺伝子変異処理を行った。

2) 変異処理を行ったプラスミドを用いて *B. longum* 105-A 株を形質転換し、得られた形質転換体についてコロニー径の違いに基づき TS 変異株のスクリーニングを行った。

3) 取得した TS プラスミドを用いて *B. longum* 105-A 株を形質転換し、得られた形質転換体の表現型 (温度感受性) を調べた。

### 2-3. 研究成績

#### 2-3-1. pKKT427 について

ビフィズス菌-大腸菌シャトルベクターである pKKT427 には、ビフィズス菌内でのプラスミド複製に必要な repB 遺伝子を含む pTB6 領域、選択マーカーとして spectinomycin (Sp) 耐性遺伝子、マルチクロニングサイト、および大腸菌内でプラスミド複製に必要な ColE I ori が存在している。

#### 2-3-2. *B. longum* 105-A 株の培養温度の検討

pKKT427 を保持する *B. longum* 105-A 株を MRS+Sp 寒天培地に播種し、37°C で前培養を行った。得られた菌体を新鮮な MRS+Sp 寒天培地に播種し、30°C から 43°C の温度で培養を行った。42°C 以下の温度では菌体の生育が確認できたが、43°C では生育は確認できなかった。この結果に基づいて、TS 変異株のスクリーニングには 30°C および 42°C の培養温度を用いることにした。

#### 2-3-3. TS プラスミドの取得

#### a) 遺伝子変異処理

pKKT427 について PCR 法に基づいた部位特異的な遺伝子変異処理を行った。pKKT427 を PCR 反応の鋳型 DNA に用いて、ビフィズス菌内でのプラスミド複製に必要な領域である pTB6 領域を PCR 法にて増幅した。pTB6 領域内にランダムに変異が導入された PCR 産物を用いて、正常な pKKT427 上の pTB6 領域と入れ替えた。このようにして pTB6 領域の変異部位が異なる複数のプラスミドを取得した。

#### b) TS 変異株のスクリーニング

変異処理したプラスミドを用いて *B. longum* 105-A 株を形質転換し、MRS+Sp 寒天培地に塗布した。30°C で 48 時間培養し、小さなコロニーが現れたところで培養温度を 42°C にシフトして 24 時間培養を行った。TS プラスミドを保持するコロニー (TS 変異株) は 42°C の培養では増殖不可能であるためコロニー径に変化は見られない。このようにコロニー径の違いに基づいて TS 変異株のスクリーニングを行った。比較的コロニー径が小さなものを新鮮な MRS+Sp 寒天培地に植え継ぎ、30°C で 24 時間培養した。植え継いだコロニーをさらに新鮮な MRS+Sp 培地に植え継ぎ、42°C で 24 時間培養した。コロニーの生育状況を確認して、30°C では生育可能であるが、42°C で生育できなかったコロニーを TS 変異株の候補とした。植え継ぎを行った小コロニー約 2,000 個中 1 個の TS 候補株を取得することができた。

#### 3-2-4. TS プラスミドの DNA シークエンス解析

TS プラスミドの変異部位を調べるために、pTB6 領域を対象にして DNA シークエンス解析を行った。合計 5 カ所の点変異が確認され、変異箇所は pTB6 領域の 20:G→T、883:G→T、1214:G→A、1416:A→T および 1423:G→A であった。883:G→T、1214:G→A がプラスミド複製に関与する repB 遺伝子の ORF 上に位置していた。これら 5 カ所の変異のうちアミノ酸置換が起きていたのは 883:G→A のみであり、Ser→Ile に置換していた。

#### 3-2-5. TS プラスミドの再現性試験

TS プラスミドを再度 *B. longum* 105-A 株に導入することで Ts の表現型を示すかどうかを調べた。TS 候補株からプラスミド抽出を行い、これを用いて *B. longum* 105-A 株の形質転換を行った。形質転換後、MRS+Sp 寒天培地に塗布して 30°C および 42°C で 48 時間培養を行った。形質転換体の表現型を確認したところ、30°C では多数のコロニーの生育が見られた。これに対して 42°C ではコロニーの生育は全く見られなかった。この結果から、42°C ではプラスミドの複製が阻害されることが示唆された。また、再現性試験を数回行ったと

ころ、同様に温度感受性を示した。

### 3-3 遺伝子破壊株の作製

3-3-1. Ts プラスミドに破壊の標的遺伝子の  
上流 1,000 bp、下流 1,000 bp およびスペク  
チノマイシン (Sp) 耐性遺伝子を挿入し、遺  
伝子破壊用プラスミドを作製した。作製した  
プラスミドを用いて *B. longum* NCC2705 株を  
形質転換した。得られた形質転換体を用いて、  
42° C の高温で培養することで相同組換え株  
の選択を行った。この高温培養では double  
crossover の相同組換えによる遺伝子破壊株  
だけでなく、single crossover の相同組換え  
によりプラスミドがゲノム上に挿入された  
integrant も含まれてしまうため、さらに抗  
生物質による遺伝子破壊株のスクリーニン  
グを行った。約 600 個の相同組換え体をスク  
リーニングした結果、11 個の遺伝子破壊株候  
補を取得することができた。これら候補株に  
ついて PCR 法で遺伝子破壊の確認を行ったと  
ころ、全ての候補株で標的遺伝子の破壊を確  
認することができた。

### 3-3-2. *B. longum* NCC2705 株 および *B. adolescentis* ATCC15703 株における温度感 受性試験

Ts プラスミドを用いて *B. longum* NCC2705  
株および *B. adolescentis* ATCC15703 株の形  
質転換を行った。*B. adolescentis* ATCC15703  
株については、形質転換効率が非常に低いた  
め、PAM 法を用いて形質転換効率を向上させ  
、形質転換体を取得した。両菌株の形質転換体  
を Sp を添加した MRS 液体培地で 30° C で培  
養した。増殖した菌体液を希釈した後、Sp を  
添加した MRS 寒天培地にプレーティングした。  
これら寒天培地を 30° C および 42° C で培養  
し、温度感受性を示すかどうかを調べた。結  
果として、本研究で用いた Ts プラスミドは  
*B. longum* NCC2705 株および *B. adolescentis*  
ATCC15703 株の両菌株において温度感受性を  
示すことがわかった。

### 3-3-3. *B. longum* 105-A 株における相同領域 の長さと同組換え頻度の関係性

相同領域の長さと同組換えの関係性を  
調べるために、*B. longum* 105-A 株のゲノム  
を鋳型にして PCR を行い 250 bp、500 bp、1,000  
bp、1,500 bp、2,000 bp、2,500 bp および 3,000  
bp の長さの DNA 断片を取得した。DNA それぞ  
れの断片を Ts プラスミドに挿入し、相同組  
換え用プラスミドを作製した。これらプラス  
ミドを用いて *B. longum* 105-A 株を形質転換  
した。得られた形質転換体を Sp を添加した  
MRS 液体培地で培養した。増殖した菌液を段  
階希釈した後、MRS 寒天培地および Sp を添加  
した MRS 寒天培地にプレーティングした。こ  
れらの寒天培地を 42° C および 30° C で培養

し、相同組換えの頻度を算出した。実験の結  
果、相同配列が 250 bp から 1,000 bp までは  
相同組換え頻度に上昇がみられたが、相同配  
列が 1,000 bp を越えると相同組換え頻度に  
大きな変化はみられず、1000 個の細胞に 1 個  
(10<sup>-3</sup>) のオーダーで組換えが起きているこ  
とがわかった。この結果から、1,000 bp 程度  
の相同領域があれば *B. longum* 105-A 株にお  
いて比較的高頻度で相同組換えが起こること  
がわかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
は下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Fukuda, S., H. Toh, K. Hase, K. Oshima,  
Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J.  
M. Clarke, D. L. Topping, T. Suzuki, T.  
D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita,  
M. Hattori, and H. Ohno. 2011.  
*Bifidobacteria* can protect from  
enteropathogenic infection through  
production of acetate. *Nature*  
469:543-7. (査読あり)
2. Yokoyama, S., T. Niwa, T. Osawa, and T.  
Suzuki. 2010. Characterization of an  
O-desmethylangolensin-producing  
bacterium isolated from human feces.  
*Arch. Microbiol.* 192:15-22 DOI  
10.1007/s00203-009-0524-5. (査読あり)
3. Yasui, K., M. Tabata, S. Yamada, T. Abe,  
T. Ikemura, R. Osawa, and T. Suzuki. 2009.  
Intra-species Diversity Between Seven  
*Bifidobacterium adolescentis* Strains  
Identified by Genome-wide Tiling Array  
Analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*  
73:1422-1424. (査読あり)
4. Yasui, K., Y. Kano, K. Tanaka, K.  
Watanabe, M. Shimizu-Kadota, H.  
Yoshikawa and T. Suzuki. 2009.  
Improvement of bacterial transformation  
efficiency using plasmid artificial

- modification. *Nucleic Acids Res* 37:e3, doi: 10.1093/nar/gkn884. (査読あり)
5. Yokoyama, S.-I., and T. Suzuki. 2008. Isolation and characterization of a novel equol-producing bacterium from human feces. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:2660-2666. (査読あり)
- [学会発表] (計 15 件)
1. Jianlong, H. and T. Suzuki. *Expression of catalase gene affords toleranceto oxygen in Bifidobacterium longum 105-A. in 3rd Intnational Symposium on Propionibacteria and Bifidobacteria.* 2010. Oviedo, Spain.
2. Sakaguchi, K. and T. Suzuki. *Construction and molecular characterization of the temperature sensitive plasmid for Bifidobacterium longum. in 3rd Intnational Symposium on Propionibacteria and Bifidobacteria.* 2010. Oviedo, Spain.
3. 横山慎一郎, 大島健志朗, 野村泉, 鈴木徹. *ダイズイソフラボンをEquolに変換するEggerthella sp. YY7918のゲノム解析.* in 農芸化学会大会. 2010. 東京大学駒場キャンパス.
4. 横山慎一郎, 野村泉, 鈴木徹, 大島健志朗, 服部正平. *ダイズイソフラボンをO-DMAに変換するヒト腸内由来の新規Clostridium Cluster XIVa細菌 SY8519株のゲノム解析.* in 日本乳酸菌学会2010年度大会 2010. フォレスト仙台.
5. 稲垣瑞穂, 中家修一, 野原大輔, 矢部富雄, 金丸義敬, 鈴木徹. *牛乳ラクトフォリン (milk GlyCAM-1)のN型糖鎖構造の多様性.* in 農芸化学会大会. 2010. 東京大学駒場キャンパス.
6. 賀建龍 鈴木徹. *Bifidobacterium longum* で機能するプロモーターの活性比較. in 農芸化学会大会. 2010. 東京大学駒場キャンパス.
7. 安井一将, 坂口広太, 加納康正, 門多真理子, 吉川博文, 鈴木徹. *プラスミド人工修飾法 (PAM)によるビフィズス菌の遺伝子導入系の開発* in 第13回 腸内細菌学会. 2009. 北里大学薬学部, 東京.
8. 榊原由佳, 渥美元規, 中村浩平, 北本則行, 鈴木徹, 高見澤一裕. *Aspergillus oryzae* のキシリトール代謝関連遺伝子削除株によるキシリトール生産. in 生物工学会67回大会. 2009. 名古屋大学東山キャンパス.
9. 渡辺寛, 廣崎辰也, 東崎正, 鈴木徹, 園元謙二, 門多真理子, 吉川博文. *枯草菌を用いたPAM(Plasmid Artificial Modification)法による乳酸球菌Lactococcus lactis IO-1株の形質転換頻度の改善.* in 日本乳酸菌学会2009年度大会 2009. ベルクラシック甲府.
10. Sakaguchi, K., N. Funaoka, Y. Kano, and T. Suzuki. *A repeatable gene disruption method for Bifidobacterium longum 105-A. in 9th Symposium on Lactic Acid Bacteria.* 2008. Egmond, Netherlands: FEMS.
11. Suzuki, T., H. Tabata, K. Suganuma, K. Yasui, K. Tanaka, K. Watanabe, K. Sakaguchi, T. Abe, T. Ikemura, and R. Osawa. *Complete genome structure of Bifidobacterium adolescentis ATCC15703 and inter strain genome-wide polymorphism between 7 B. adolescentis strains using tilling array analyses.* in 9th Symposium on Lactic Acid

- Bacteria*. 2008. Egmond, Netherlands: FEMS.
12. Yasui, K., Y. Kano, and T. Suzuki. *Plasmid artificial modification (PAM): a genomic information-based method to improve transformation efficiency in Bifidobacterium adolescentis ATCC15703*. in *9th Symposium on Lactic Acid Bacteria*. 2008. Egmond Netherlands: FEMS.
  13. 安井一将, 鈴木徹, 加納康正. プラスミド人工的メチル化 (PAM)による *Bifidobacterium adolescentis ATCC15703*の形質転換 効率の向上. in 日本乳酸菌学会2008年度大会 2008. 京都大学百周年時計台記念館.
  14. 横山慎一郎, 鈴木徹. ヒト糞便由来の新規 *Equol* 産生菌の単離と諸性質について. in 生物工学会60回大会. 2008. 東北学院大学土樋キャンパス.
  15. 鈴木徹, 田端大嗣, 菅沼宏美, 安井一将, 田中香お里, 渡邊邦友, 池村淑道, 阿部貴志, 大澤朗. タイリングアレイと自己組織化マップを用いた *Bifidobacterium adolescentis* 菌株間のゲノム多型の網羅的解析. in 第12回 腸内細菌学会. 2008. 東京大学 弥生講堂.

[図書] (計3件)

1. **鈴木徹**. 2011. 染色体 DNA の遺伝解析. 世紀を超えるビフィズス菌の研究. その基礎と臨床応用から 製品開発へ. 日本ビフィズス菌センター.
2. **Suzuki, T., and K. Yasui**. 2011. Plasmid Artificial Modification: A Novel Method for Efficient DNA Transfer into Bacteria. In J. A. Williams (ed.), Strain

Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 2011. A Humana Press.

3. **Fukiya, S., T. Suzuki, Y. Kano, and A. Yokota**. 2010. Current status of Bifidobacterium gene manipulation technology. In K. Sonomoto and A. Yokota (ed.), Lactic Acid Bacteria: Sophisticated Progress, . Horizon Scientific Press, UK.

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 徹 (SUZUKI TOHRU)  
岐阜大学・連合農学研究科・教授  
研究者番号: 20235972

