

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02893

研究課題名(和文)腸内細菌叢内のビフィズス菌の遺伝子発現プロファイルの解明：選択的な回収方法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the gene expression profile of bifidobacteria in the gut microbiota: development of selective recovery method

研究代表者

吹谷 智 (Fukiya, Satoru)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：10370157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：ビフィズス菌が腸内細菌叢の中で生存する分子レベルの機構を明らかにするために、通常飼育マウス腸内に投与したビフィズス菌株を選択的に回収する実験系を構築し、腸内細菌叢存在下での遺伝子発現プロファイルの取得を試みた。細胞表層にペプチドタグを発現する4種類の表層タグ発現株を構築した。タグ発現と表層への提示を検証したのち、4種類のタグの中でStrep-tagIIを発現した発現株を用いて、最適と考えられる回収方法を*in vitro*で確立した。また確立した方法を適用して、人工腸内細菌叢からタグ発現株を実際に選択的に回収できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ペプチドタグを細胞表層に発現するビフィズス菌株を構築し、人工腸内細菌叢からビフィズス菌を選択的に回収する方法を確立した。これまで腸内細菌叢存在下でのビフィズス菌の詳細な遺伝子発現プロファイルは得られていないが、本研究の成果はその情報を得るためのブレークスルーとなる。また本研究の今後の進展により、ビフィズス菌の腸内での生存機構を明らかにすることが期待される。これにより、様々な健康効果をもたらすビフィズス菌を腸内でどのように維持し、人々の健康維持に貢献するかという社会的な課題に応える基盤的な情報を得ることができる。したがって、本研究の成果は社会的にも重要な成果であると評価できる。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms of how bifidobacteria survive in the intestine are not fully understood especially in the presence of the gut microbiota. To clarify the mechanisms, we tried to establish an experimental system to collect *Bifidobacterium longum* administered into the conventional mouse intestine selectively to obtain its gene expression profiles in the presence of gut microbiota. Four kinds of *B. longum* strains expressing different peptide tags on the cell surface were constructed as a fusion with the surface-presenting protein. After verifying the tag expression and surface presentation, we established an optimum collection method *in vitro* using the Strep-tagII. In addition, the tag-expressing strain was successfully recovered from the artificial gut microbiota using the established collection method.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌 選択的回収 腸内細菌叢 腸内生存 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢の中では、数百種から千種、数にして数十兆個もの腸内細菌が高密度で存在し、それぞれが異なるエネルギー獲得・代謝反応を行って、腸内で生存している。このような「複雑な腸内細菌叢の中で、それぞれの腸内細菌がどのようにして生存しているのか？」という問いは、腸内細菌研究における極めて根源的な問いである。

この問いに答える手段としては、細胞の生命活動の状況を包括的に知ることができるトランスクリプトーム解析が非常に有効である。実際に、単一または少数の腸内細菌種を無菌マウス腸管に植え付けたノトバイオートマウスを用いた解析が行われているが、この場合常在の腸内細菌叢の影響は無視されてしまう。また常在腸内細菌叢全体のメタトランスクリプトーム解析も行われているが、各菌種の存在比率は基本的に低いため、個々の菌種の詳細な遺伝子発現プロファイルを知ることはできない。したがって、上記の問いの答えに迫るためには、腸内細菌叢存在下での個々の菌種の詳細な遺伝子発現プロファイルを得ることが必要不可欠である。

これを達成する戦略としては、腸内での遺伝子発現プロファイルを保ったまま、目的とする細菌種のみを腸内細菌叢から回収し、トランスクリプトーム解析を行うアプローチが有効である。しかしこれまでのところ、その様なアプローチは確立されておらず、細胞の分離・回収に頻用されるサイトメトリーの主要な国際学会においても、今後の大きな課題として議論されている。

そこで我々は、ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* 105-A 株を題材として、上記のアプローチを確立することが出来るのではないかと考えた(図1)。これまでに我々は、科学研究費等の支援により、形質転換すら困難であったビフィズス菌の遺伝子変異導入系・遺伝子発現系を世界に先駆けて確立している(1,2)。さらに、マウス腸内への定着が困難なヒト由来ビフィズス菌である *B. longum* 105-A 株を、通常飼育マウス腸内に 10^8 cfu/g 糞便という高い菌濃度で定着可能な飼育試験系の確立に成功している。本研究では遺伝子発現系を利用して、*B. longum* 105-A 株を特異的に識別できるペプチドタグを細胞表層に提示することを着想した。さらに免疫学の分野で多用されている、タグを特異的に認識する分子を結合させた磁気ビーズを用いて、目的の細胞種を分離・回収する方法を応用して、マウス常在腸内細菌叢に定着した同株を選択的に回収するのではないかと考察した。この方法を確立し、腸内細菌叢内での遺伝子発現プロファイルを解明できれば、上述の問いの答えに大きく近づくことができる。

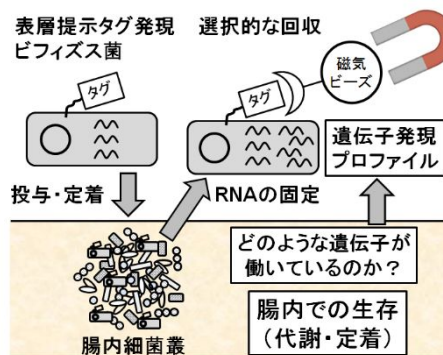


図1. 腸内細菌叢内でのビフィズス菌の遺伝子発現プロファイル解明への戦略

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では通常飼育マウス腸内に定着させた *B. longum* 105-A 株を題材として、常在腸内細菌叢からの選択的回収方法を確立し、腸内細菌叢存在下での *B. longum* 105-A 株の遺伝子発現プロファイルを得る。これにより、腸内特異的に発現する遺伝子を包括的に同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *B. longum* 105-A 株の選択的回収系の構築とその評価

B. longum 105-A 株の腸内でのトランスクリプトームを明らかにするためには、腸内での遺伝子発現の状態を保ったまま、同株の RNA を抽出する必要がある。そこで、*B. longum* 105-A 株の培養菌体を 4 種類の RNA 固定化試薬で処理し、バイオアナライザー (Agilent) を用いて RNA の品質 (分解の度合い) を評価した。

ビフィズス菌を選択的に回収するために、*B. longum* 105-A 株を特異的に識別可能なペプチドタグを細胞表層に提示し、そのタグを認識する分子を結合させた磁気ビーズを用いて目的の細胞を回収することを着想した。ビフィズス菌の糖質 ABC トランスポーターの基質結合タンパク質である GltA は、N 末端が細胞膜にアンカーされ、C 末端が細胞外へと露出している(3)。この C 末端側の領域は改変可能であることが知られているため、これを利用して、GltA の C 末端側に、ペプチドタグである Strep-TagII, FLAG, Myc, HA タグをそれぞれ付加した融合タンパク質を恒常発現するプラスミドを構築し、エレクトロポレーション法により *B. longum* 105-A 株へ導入した。構築したタグ発現株について、ウエスタンブロッティング法によりタグの発現を、免疫蛍光染色により細胞表層におけるタグの提示を評価した。続いて、磁気ビーズを用いて同株の培養菌体を回収し、DAPI を用いて回収前後の細胞を染色して細胞数を計測することで、回収率を評価した。また、2 種類の RNA 固定化試薬を用いて、固定化処理によるタグの細胞表層への発現および細胞回収への影響を調べた。他の腸内細菌存在下における回収率は、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を用いて、*B. longum* を特異的に検出することにより評価した。

(2) 1-kestose 存在下でのトランスクリプトーム解析

B. longum 105-A 株を 1% (w/v) のグルコース, 1-kestose およびスクロースを含む 1/2 MRSCS 培地で培養し, 対数増殖期の菌体を回収して, RNA を抽出した. RNA の品質を確認し, rRNA を除去したのち, サンプルを調製して, 次世代シーケンサー Illumina HiSeq を用いた RNA-Seq 解析に供した. 得られたシーケンスデータについて, HISAT2, StringTie および EdgeR の各種プログラムを用いて解析し, 有意な発現変動を示す遺伝子を同定した.

4. 研究成果

(1) *B. longum* 105-A 株の選択的回収系の構築とその評価

RNA 固定化の処理方法の検討と RNA の品質評価

市販の RNA 固定化処理試薬を始めとした 4 種の RNA 固定化試薬を用いて, RNA の品質維持効果を評価した. 具体的には, *B. longum* 105-A 株の培養菌体に固定化処理を施したのち, Total RNA を抽出し, バイオアナライザー (Agilent) を用いて RNA の品質を評価した. その結果, RNeasy Protect Bacteria Reagent (QIAGEN) または Bacterial isolation buffer (4)を用いることで, *B. longum* 105-A 株の RNA の品質を高く保つことができることが明らかになった.

表層タグ発現株の構築

ビフィズス菌の糖質 ABC トランスポーターの基質結合タンパク質である GltA の C 末端側(細胞外へと露出する)に, 選択的な回収に必要な 4 種類の候補ペプチドタグ(Strep-tagII, FLAG, HA, Myc)をそれぞれ付加したタグ融合 GltA を発現可能なプラスミドを構築した. これらを *B. longum* 105-A 株に導入し, 4 種類の表層タグ発現株を構築した.

表層タグ発現株におけるタグ発現の検証

培養した表層タグ発現株菌体の全タンパク質に対して, 各タグに特異的に結合する分子または抗体を用いて, ウェスタンブロット解析を行った. その結果, 4 種類のタグ全てが GltA との融合タンパク質として発現していることが確認された. 次に, 表層タグ発現株を培養し, 免疫蛍光染色を行い, 蛍光顕微鏡を用いて細胞表層へのタグの提示を評価した. その結果, Strep-tagII 発現株が最も高いタグ検出率を示したことから, 4 種の中で Strep-tagII が最も高い割合で細胞表層へ提示されていることが明らかになった.

表層タグ発現株の回収方法の検討

細胞表層へのペプチドタグの提示が確認された 4 種類の表層タグ発現株について, それぞれ単独での培養を行い, タグ提示細胞の回収方法の検討と回収率の評価を進めた. Strep-tagII 発現株については, Strep-tagII と特異的に結合する分子である Strep-Tactin が付加された磁気ビーズを用いて回収を行った. FLAG, HA, Myc タグ発現株については, それぞれのタグに特異的なビオチン標識済み抗体を用いてタグに結合させ, ストレプトアビジンビーズを用いて回収を行った. これらの試験の結果, RNA Protect Bacteria Reagent で処理した Strep-tagII 発現株の回収率が最も高く, 全細胞の 40% を回収できることが明らかになった. 一方他のペプチドタグを用いた場合の回収率は 1~4% であった. これらの結果から, Strep-tagII 発現株と磁気ビーズによる回収が腸内からの細胞回収に最も適していると判断した.

Strep-tagII タグ発現株を用いた人工腸内細菌叢からの回収方法の検討

これまでの評価で最も効率よく *B. longum* 105-A 株を回収できることが明らかになった Strep-tagII 発現株について, 複数の代表的な腸内細菌種からなる人工腸内細菌叢からの回収を検討した. タグ発現株およびヒト腸内細菌叢の優占種である 7 種の細菌種 (Bacteroidetes 門 3 種, Firmicutes 門 2 種, Actinobacteria 門 2 種) をそれぞれ培養し, 同一濁度となるように混合して人工腸内細菌叢を作成した. ここから Strep-Tactin 結合ビーズを用いてタグ発現株の回収を行った. *B. longum* 特異的プローブを用いて FISH 法によりタグ発現株を検出し, 回収前後のタグ発現株の菌数を比較して回収率を評価した. その結果, 25% の回収率, 90% 以上の純度でタグ発現株を回収できたことから, 他の腸内細菌存在下でもタグ発現 105-A 株の回収が可能であることが明らかになった.

これまで腸内細菌叢から特定のビフィズス菌を選択的に回収できる手法は世界的にも開発されておらず, 本研究の成果が初の事例となる. 開発した系を用いて実際に通常飼育マウス腸内に定着させたタグ発現 *B. longum* 105-A 株の回収が達成されれば, 腸内細菌叢存在下でのビフィズス菌の遺伝子発現プロファイルの解明に向けて, 大きな一歩となると考えられる.

(2) 1-kestose 存在下でのトランスクリプトーム解析

これまでの研究で, 1-kestose の摂取により *B. longum* 105-A 株の通常飼育マウス腸内への定着が達成されている. そこで腸内での遺伝子発現プロファイルの比較対照となる, 1-kestose 存在下で培養した際の同株の遺伝子発現プロファイルの取得を行った. RNA-Seq 解析の結果, 1-kestose 存在下での遺伝子発現プロファイルが得られ, グルコース存在下と比較して 127 個の遺伝子が有意に発現変動していることが明らかになった.

<引用文献>

Hirayama Y, Sakanaka M, Fukuma H, Murayama H, Kano Y, Fukiya S, Yokota A. 2012. Development of a double-crossover markerless gene deletion system in *Bifidobacterium longum*: functional analysis of the α -galactosidase gene for raffinose assimilation. *Appl Environ Microbiol* 78:4984–4994.

Sakanaka M, Tamai S, Hirayama Y, Onodera A, Koguchi H, Kano Y, Yokota A, Fukiya S. 2014. Functional analysis of bifidobacterial promoters in *Bifidobacterium longum* and *Escherichia coli* using the α -galactosidase gene as a reporter. *J Biosci Bioeng* 118:489–495.

Suzuki R, Wada J, Katayama T, Fushinobu S, Wakagi T, Shoun H, Sugimoto H, Tanaka A, Kumagai H, Ashida H, Kitaoka M, Yamamoto K. 2008. Structural and thermodynamic analyses of solute-binding protein from *Bifidobacterium longum* specific for core 1 disaccharide and lacto-*N*-biose I. *J Biol Chem* 283:13165–13173.

Nobori T, Velásquez AC, Wu J, Kvitko BH, Kremer JM, Wang Y, He SY, Tsuda K. 2018. Transcriptome landscape of a bacterial pathogen under plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E3055–E3064.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮下 聖也、吉田 佳鼓、嶋田 みな、前田 智也、横田 篤、吹谷 智
2. 発表標題 腸内細菌叢からのビフィズス菌の選択的回収系の確立
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 難波 有希、倉持 碧海、山口 颯人、吉田 佳鼓、後藤 恭宏、門田 吉弘、栃尾 巧、小椋 義俊、林 哲也、前田 智也、横田 篤、吹谷 智
2. 発表標題 Bifidobacterium longum subsp. longum における1-Kestose 代謝メカニズムの解明
3. 学会等名 日本乳酸菌学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮下聖也, 吉田佳鼓, 嶋田みな, 前田智也, 横田篤, 吹谷智
2. 発表標題 腸内細菌叢中に存在するビフィズス菌の選択的回収系の確立
3. 学会等名 令和4年度 日本農芸化学会 北海道・東北支部 合同支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 難波 有希、倉持 碧海、山口 颯人、吉田 佳鼓、後藤 恭宏、門田 吉弘、栃尾 巧、小椋 義俊、林 哲也、前田 智也、横田 篤、吹谷 智
2. 発表標題 Bifidobacterium longum subsp. longum における1-Kestose 代謝メカニズムの解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 難波有希, 倉持碧海, 山口颯人, 吉田佳鼓, 後藤恭宏, 門田吉弘, 栃尾 巧, 小椋義俊, 林 哲也, 横田 篤, 吹谷 智
2. 発表標題 1-Kestose存在下で発現変動するビフィズス菌遺伝子のRNA-Seqによる同定
3. 学会等名 日本生物工学会北日本支部2021年度第1回若手シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 難波有希, 吉田佳鼓, 山口颯人, 後藤恭宏, 門田吉弘, 栃尾 巧, 小椋義俊, 林 哲也, 横田 篤, 吹谷 智
2. 発表標題 Bifidobacterium longum subsp. longum における1-Kestose 代謝メカニズムの解明
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 佳鼓, 嶋田 みな, 宮下 聖也, 前田 智也, 横田 篤, 吹谷 智
2. 発表標題 腸内細菌叢中に存在するビフィズス菌の選択的回収系の確立
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吹谷 智
2. 発表標題 Insertion Sequencing法によるビフィズス菌の腸内生存に寄与する遺伝子の同定
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吹谷 智
2. 発表標題 ビフィズス菌の腸内生存機構の解明に向けた遺伝子操作ツールの応用
3. 学会等名 第1回ビフィズス菌研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	後藤 恭宏 (Gotoh Yasuhiro) (20558358)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------