

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23780072  
 研究課題名（和文） 部位特異的組換え系を利用したビフィズス菌の腸内特異的発現遺伝子の探索  
 研究課題名（英文） Screening of bifidobacterial genes specifically expressed in the mouse intestine using a site-specific recombination system  
 研究代表者  
 吹谷 智（FUKIYA SATORU）  
 北海道大学・大学院農学研究院・助教  
 研究者番号：10370157

研究成果の概要（和文）：ビフィズス菌はヒトの健康に対して様々な有用効果を持つことが広く知られている腸内細菌であるが、それらの効果の分子レベルでの発現機構については、いまだ不明な点が多い。この機構を解明することを目的として、本研究ではビフィズス菌の染色体上への遺伝子導入技術の確立を行い、それを基盤として、腸内で特異的に発現するビフィズス菌の遺伝子を同定する系の構築を行った。本研究成果は、ビフィズス菌の持つ健康への有用効果に分子レベルでの根拠を与える上で重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Bifidobacteria are a major component of the human intestinal microbiota and well-known for their health-promoting effects. However, molecular mechanisms of the effects are still unclear. This study aimed to clarify the mechanisms of the effects by indentifying bifidobacterial genes that are specifically expressed in the intestine. A molecular tool for introduction of the foreign genes to bifidobacterial chromosome was developed. Screening system of the specifically-expressed genes has been constructed based on the developed tool. These progresses are thought to be important for providing evidence at a molecular level for the beneficial effects of bifidobacteria.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌，健康増進効果，部位特異的組換え，R-IVET，特異的遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

ビフィズス菌は整腸作用や免疫機能の賦活化など、ヒトの健康に対して様々な有用効果を持つことが広く知られている。そのため食品・健康産業上、非常に重要な微生物の一つである。しかし、「ビフィズス菌がどのようにして腸内で定着し、健康に有用な効果を発揮しているのか」という分子機構の解明は、ビフィズス菌の研究において最大の課題として残されたままである。この課題を解明するためには、「腸内でビフィズス菌のどのような遺伝子が発現し、機能しているのか」を明らかにする必要がある。

それにはビフィズス菌の遺伝子操作系の確立が必要である。しかし、遺伝子欠損変異の導入や、転移因子によるランダム変異導入については、報告されていない。研究代表者は上記のビフィズス菌研究の状況を鑑みて、ビフィズス菌の遺伝子操作系の開発に着手した。これまでに転移活性を持つ転移因子 *ISBlol5* を単離し (Fukiya *et al.*, **J. Biosci. Bioeng.**, 2010; 業績 1), ランダム変異導入系の確立を進めている。さらに最近、二重相同組換え法を用いて、ゲノム上に遺伝子欠損や外来遺伝子を導入するゲノム改変手法を世界に先駆けて確立した (平山・吹谷ら, 2010)

年度日本乳酸菌学会)．研究代表者はこのゲノム改変手法をさらに応用することにより、腸内で特異的に発現する遺伝子を同定することが可能であると考え、本研究を推進した。

## 2. 研究の目的

上記のゲノム改変手法の開発により、ビフィズス菌の遺伝子機能を解明する道が拓かれた．本研究では、この手法を応用して、ある環境において特異的に発現する遺伝子を網羅的に同定する手法である R-IVET (Recombinase-based in vivo expression technology) 法を構築し、腸内で特異的に発現するビフィズス菌の遺伝子を明らかにすることを目的とする．

## 3. 研究の方法

R-IVET 法は、病原細菌の病原性発現に特異的に働く遺伝子を同定する方法として用いられてきた．しかし広い意味では「ある環境において特異的に発現する遺伝子を同定する手法」と捉えることが出来る．本手法は Cre/loxP という部位特異的な組換え系を利用している (図2)．Cre リコンビナーゼ (以下 Cre とする) ORF の上流に挿入されたゲノム DNA 断片の中に、プロモーターが存在すると、Cre が発現する．発現した Cre の作用により、特異的標的配列である loxP に挟まれたゲノム上の薬剤耐性遺伝子が除去される．これを指標として、ゲノム DNA 断片の中に、腸内で特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域があるかを判別できる (表1)．

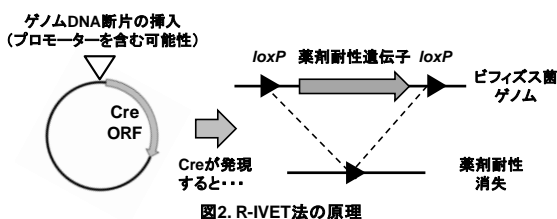


図2. R-IVET法の原理

表1 腸内特異的に発現する遺伝子の選抜方法

ゲノムDNA断片中の 遺伝子プロモーター	薬剤耐性	
	培地上での選抜	マウス投与後の選抜
a) プロモーターなし	あり	あり
b) 培地上で発現する	なし	(投与されない)
c) 腸内特異的に発現	あり	なし

この R-IVET 法をビフィズス菌で確立するため、以下の材料の構築を中心に研究を進めた．  
・ 確立したゲノム改変手法を用いて、loxP-薬剤耐性遺伝子-loxP をビフィズス菌染色体に導入

・ Cre 発現用プラスミドの構築

(1) ビフィズス菌のマウス経口投与試験系の確立：野生株 *Bifidobacterium longum* 105-A にクロラムフェニコール耐性遺伝子 (CmR) を持つプラスミドを導入した株を構築した．これを供試菌株として、MRS 培地を用いて嫌気培養を行い、PBS を用いて  $10^9$  cfu

(colony-forming unit)/mL の菌懸濁液を調製した．これを4週齢の BALB/c マウスへ経口投与し、採取した糞便を PBS に懸濁・段階希釈することにより調製した糞便懸濁液を、2.5 μg/mL の Cm を含む TOS-プロビオン酸培地に接種し、嫌気チャンバー内で培養することにより、糞便中の 105-A 株の生菌数を測定した．

(2) 相同組換えによるビフィズス菌染色体上への遺伝子導入法の確立：ビフィズス菌内で複製できない相同組換え用ベクター pBS423-ΔrepA (スペクチノマイシン耐性：SpR) およびそれに不和合性を示す大腸菌-ビフィズス菌シャトルベクター pTBR101-CM (CmR) を用いて、二重相同組換え法による染色体上遺伝子への欠失変異導入を試みた．まず標的遺伝子とした α-ガラクトシダーゼ遺伝子 (aga) の上流および下流の染色体領域を pBS423-ΔrepA に連結して構築したプラスミドを、エレクトロポレーション法により 105-A 株に導入した．Sp 耐性により選抜した一回目の相同組換え体に対して、同様の手法で pTBR101-CM を導入し、Cm 耐性により2回目の相同組換え体の選抜を行った．得られた二回目の相同組換え体の中から、PCR 増幅およびラフィノースの資化性を指標として、aga 欠失株を同定した．

(3) 新たな薬剤耐性マーカーを持つビフィズス菌遺伝子導入ベクターの構築と評価：

SpR 以外の薬剤耐性マーカーを持つシャトルベクターを構築するために、SpR 遺伝子を持つシャトルベクター pBS423 をベースに、エリスロマイシン耐性遺伝子 (EmR) を連結し、新たなシャトルベクター pBFH4 を構築した．同様に相同組換え用ベクター pBS423-ΔrepA をベースに、CmR または EmR を連結し、新たな相同組換え用ベクター2種 (pBFH1 および pBFH3) を構築した．構築したベクターを 105-A 株に導入し、薬剤耐性を評価した．

(4) loxP-SpR-loxP 配列のビフィズス菌染色体への導入：loxP-SpR-loxP 配列の両端に *B. longum* 105-A 株染色体上の遺伝子間領域の相同部位を付加した断片を、SpR 領域を除いて増幅した pBS423-ΔrepA の断片と連結し、染色体導入用ベクターを構築した．このベクターと(2)で確立した遺伝子導入法を用いて、元株である *B. longum* 105-A 株の染色体の標的領域に loxP-SpR-loxP 配列の導入を試みた．  
(5) Cre リコンビナーゼ発現用プラスミドの構築：プロモーター領域の無い Cre ORF を、ビフィズス菌シャトルベクター (CmR) にクローン化した．

#### 4. 研究成果

(1) ビフィズス菌のマウス経口投与試験系の確立: 野生株 *Bifidobacterium longum* 105-A がマウス腸内で生存可能であるかを明らかにするため、BALB/c マウスへ 105-A 株を経口投与し、糞便中の 105-A 株の生菌数を経時的にモニターした。10<sup>9</sup> cfu の 105-A 株を経口投与したところ、105-A 株は投与後 6 時間目に最も多く糞便中に検出され、その後 24 時間目まで糞便中に継続して検出された。この結果から、105-A 株はマウス腸内で死滅せずに腸内を通過できることが明らかとなった。

(2) 相同組換えによるビフィズス菌染色体上への遺伝子導入法の確立: R-IVET 法の確立に向けて、親株である *B. longum* 105-A 株の染色体上へ *loxP*-薬剤耐性遺伝子-*loxP* 配列を導入する必要がある。そのため、二重相同組換え法による染色体上への遺伝子導入法を検討した。実際に 2 種類のベクターを用いて、染色体上の *aga* 遺伝子に欠失変異を導入できたことから、105-A 株の染色体上への遺伝子導入が可能であることが示された。

(3) 新たな薬剤耐性マーカーを持つビフィズス菌遺伝子導入ベクターの構築と評価:

R-IVET 法の確立に必要な Cre リコンビナーゼ発現プラスミドを構築するためには、前述の SpR 以外の薬剤耐性遺伝子が選択マーカーとして必要である。そのため、①EmR を持つシャトルベクター pBFH4 および②CmR または EmR を持つ相同組換え用ベクター (ビフィズス菌内で複製されない) 2 種 (pBFH1 および pBFH3) を上述の方法で構築した。

構築したベクターを 105-A 株に導入し、薬剤耐性を評価したところ、①の pBFH4 については、Em による形質転換体の選抜が可能であったため、プラスミドで EmR が保持された場合は Em に対する耐性を 105-A 株に付与できることが明らかになった。

一方②の相同組換え用ベクター 2 種 (pBFH1 および pBFH3) については、Cm および Em による選抜は出来なかった。これは 105-A 株の染色体上に組み込まれた CmR または EmR 遺伝子の発現が、耐性を付与するには不十分であるためと考えられる。

これらの結果と、これまで用いてきたベクターによる薬剤耐性の付与の結果を総合すると、プラスミドとして保持される場合は SpR、CmR および EmR が、染色体に組み込まれる場合は SpR のみが、105-A 株における薬剤耐性マーカーとして使用できることが明らかになった。このことから、Cre 発現用ベクターには Cm 耐性遺伝子を、染色体に組み込まれる *loxP*-薬剤耐性遺伝子-*loxP* 配列には、SpR を用いることとした。

(4) *loxP*-SpR-*loxP* 配列のビフィズス菌染色体への導入: *B. longum* 105-A 株染色体上の遺伝子間領域に *loxP*-SpR-*loxP* 配列の導入を試みた。結果として、二重相同組換えにより *loxP*-SpR-*loxP* 配列が標的領域に導入された 105-A::SpR 株を構築することが出来た。導入した株の培養試験による生育は元株と同等であり、当該配列の導入による生育への影響はないことを確認できた。

(5) Cre リコンビナーゼ発現用プラスミドの構築: 上述の方法で構築した Cre 発現用プラスミドを(4)で構築した 105-A::SpR 株に導入し、得られた株において Cre が発現せず、2 つの *loxP* 配列間で部位特異的相同組換えが起こっていないこと、すなわち Sp 耐性が失われていないことを確認する。Sp 耐性の消失が観察された場合は、Cre ORF の上流に転写ターミネーターを挿入して対応する。

また、既知のプロモーターを連結した Cre 強制発現プラスミドも構築し、105-A::SpR 株に導入する。これによりすべての導入株で Sp 耐性が消失していれば、Cre/*loxP* 系が 105-A 株内で十分機能していることを確認できる。これらの検証を現在行っている。

#### 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 2 件)

1. Hirayama, Y., Sakanaka, M., Fukuma, H., Murayama, H., Kano, Y., Fukiya, S., Yokota, A. Development of a double-crossover markerless gene deletion system in *Bifidobacterium longum*: functional analysis of the  $\alpha$ -galactosidase gene for raffinose assimilation.

**Appl. Environ. Microbiol.**, 78(14): 4984-4994 (2012) 査読有

2. Fukiya, S., Hirayama, Y., Sakanaka, M., Kano, Y., Yokota, A. Technological advances in bifidobacterial molecular genetics: application to functional genomics and medical treatments.

**Biosci. Microb. Food. Health**, 31(2): 15-25 (2012) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. 吹谷 智, 平山 洋佑, 横田 篤: プロバイオティクス機能の分子機構解明に向けたビフィズス菌の遺伝子欠損導入系の開発 (招待講演). 大会シンポジウム 4SY24 「プロバイオティクスの機能評価と新展開 -ヒトの健康と疾病予防を支える乳酸菌とビフィズス菌-

日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 27 日, 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙

台市)

2. 吹谷 智, 平山洋佑, 阪中幹祥, 福間英訓, 村山寛樹, 加納康正, 横田 篤: 二重相同組換え法を用いた *Bifidobacterium longum* の染色体上遺伝子への欠失変異導入技術の開発. 第7回日本ゲノム微生物学会年会, 2013年3月10日, 長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)

3. 阪中幹祥, 阿部光紗, 平山洋佑, 吹谷 智, 加納康正, 横田 篤: ランダム変異導入法への応用を目指したピフィズス菌由来挿入配列 TLS143 の機能解析. 第6回日本ゲノム微生物学会年会, 2012年3月10日, 立教大学(東京都)

4. Satoru Fukiya, Mikiyasu Sakanaka, Arisa Abe, Yosuke Hirayama, Yasunobu Kano, Atsushi Yokota: Characterization of transposition property of IS3 family insertion sequence TLS143 isolated from *Bifidobacterium longum* 105-A.

6th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria, 2011年9月8日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)

5. Yosuke Hirayama, Hidenori Fukuma, Hiroki Murayama, Satoru Fukiya, Yasunobu Kano, Atsushi Yokota: Development of targeted gene disruption technique in *Bifidobacterium longum* 105-A.

10th Symposium on Lactic Acid Bacteria, 2011年8月28日, Hotel Zuiderduin(オランダ)

6. Satoru Fukiya, Mikiyasu Sakanaka, Arisa Abe, Yosuke Hirayama, Yasunobu Kano, Atsushi Yokota:

Transposition activity and insertion property of IS3 family insertion sequence TLS143 isolated from *Bifidobacterium longum* 105-A.

10th Symposium on Lactic Acid Bacteria, 2011年8月28日, Hotel Zuiderduin(オランダ)

7. 平山 洋佑, 平山洋佑, 福間英訓, 村山寛樹, 吹谷 智, 加納康正, 横田 篤:

*Bifidobacterium longum* 105-A の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ遺伝子破壊株の性状解析とレポーターアッセイへの応用.

日本乳酸菌学会 2011 年度大会, 2011 年 7 月 11 日, 関西大学(大阪府)

[図書] (計 1 件)

Fukiya, S., Suzuki, T., Kano, Y., and Yokota, A. Current status of *Bifidobacterium* gene manipulation technologies. In Lactic Acid Bacteria: Current Progress in Advanced Research, Horizon Scientific Press, Norfolk, UK. pp. 33-51

(2011) 著書・査読無

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/biseibutsu/ja/info.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吹谷 智 (FUKIYA SATORU)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号: 13070157

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし