

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450090

研究課題名(和文) ランダム変異株集団の動態解析による腸内生存に寄与するビフィズス菌遺伝子の探索

研究課題名(英文) Exploration of bifidobacterial genes involved in the intestinal survival through a dynamics analysis of random transposon mutants of *Bifidobacterium longum*

研究代表者

吹谷 智 (FUKIYA, Satoru)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・講師

研究者番号：10370157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ビフィズス菌が腸内で生存するための分子機構については、ビフィズス菌の遺伝子変異導入系が十分確立されていないため、不明な部分が多い。本研究では、ビフィズス菌のトランスポゾン変異導入法と次世代シーケンサー解析を組み合わせて、ビフィズス菌の腸内での生存に寄与する遺伝子を同定することを目的とした。研究の成果として、まず変異導入の宿主となるビフィズス菌株の完全長ゲノム配列を決定した。さらに転移因子ISBlo11およびHimar1C9を用いて、2種類のトランスポゾン変異導入系を確立した。本研究により、ビフィズス菌が腸内で生存する機構を分子レベルで解明するための基盤技術を整備することができた。

研究成果の概要(英文)：Bifidobacteria, which exert health-promoting effects, are one of the beneficial members of the human intestinal microbiota. Molecular mechanisms of their intestinal survival are still unclear due to the insufficient development of gene-mutagenesis systems in this genus. This study aimed to identify bifidobacterial genes that contribute to the intestinal survival using combined analysis of a transposon mutagenesis and next-generation sequencing. In this study, the complete genomic sequence of the mutagenesis-host strain, *Bifidobacterium longum* 105-A, was determined. Two different transposon mutagenesis systems were developed using transposable elements ISBlo11, derived from *B. longum*, and Himar1C9. This progress will pave the way to clarify the molecular mechanisms of bifidobacterial survival in the intestine.

研究分野：応用微生物学・腸内細菌学

キーワード：トランスポゾン変異導入 転移因子 *Bifidobacterium longum* INSeq法 腸内生存 ビフィズス菌
プロモーター ゲノム解析

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生存し、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。

この腸内での生存の機構を解明するためには、「ビフィズス菌のどのような遺伝子が腸内での生存に寄与しているのか」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、転移因子によるトランスポゾン変異導入については、これまで報告されていなかった。

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。これまでの成果として、ビフィズス菌の遺伝子欠損導入系を世界に先駆けて開発した(引用文献)。また、ビフィズス菌ゲノムへのトランスポゾン変異導入を目指して、ビフィズス菌由来の転移因子である *ISBlo15* (引用文献) および *ISBlo11* (TLS143 から挿入配列の命名法に従って改名) を単離し、その転移機能を解析している。特に *ISBlo11* は、転移頻度が非常に高く、ランダムなゲノム部位に転移することが示唆されている。これらの結果から、*ISBlo11* を用いたビフィズス菌のトランスポゾン変異導入系の確立が期待された。

2. 研究の目的

上記の背景から本研究では、*ISBlo11* を用いたトランスポゾン変異導入系を確立し、それと次世代シーケンサーを用いて各変異株の同定と菌数の変化を測定する方法(INSeq法)とを組み合わせ、腸内での生存に寄与するビフィズス菌の遺伝子を網羅的に同定することを目的とした。

3. 研究の方法

INSeq法は、次世代シーケンサーの持つ a) DNA 1 分子ごとに塩基配列を決定できる、b) 一度に大量の DNA 分子の塩基配列を決定できる ($10^7 = 1,000$ 万分子以上)、という特徴を利用している。まず、変異株集団の変異部位(トランスポゾンの挿入部位)を制限消化とPCRにより増幅し、a)の特徴を利用することで、各変異株の変異部位の塩基配列情報を得ることが出来る。この情報から、各変異株の識別が可能となる。さらに、それぞれの変異部位の検出数は、各変異株の菌数を反映するため、b)の特徴を利用することにより、変異株集団中の各株の数を明らかにできる。本研究では、INSeq法を適用するのに必要なトランスポゾン変異導入系の確立を中心に研究を進めた。

(1) *Bifidobacterium longum* 105-A 株の完全長ゲノム配列の決定

長鎖DNA配列の決定が可能な次世代シーケンサーPacBio RSIIを用いて、変異導入の宿主株である *Bifidobacterium longum* 105-A 株(以下105-A株)のゲノム配列解析を行った。配列データのアセンブルを行い、過去に我々が決定したドラフトゲノム配列(未発表)との統合により、完全長ゲノム配列を決定した。遺伝子のアノテーションはg-MiGAPを用いて行い、さらに過去の文献情報から既知の遺伝子機能についてマニュアルで修正を行い、最終的なアノテーションを確定した。

(2) *ISBlo11* を用いたトランスポゾン変異導入系の確立

105-A株を宿主株として、*ISBlo11* を用いたトランスポゾン変異導入系の構築を行った。

トランスポゾン変異導入ベクターの構築: 転移因子 *ISBlo11* のIR(転移に必要な逆位反復配列)を薬剤耐性遺伝子の両端に付加し、トランスポゾンを構築した。トランスポゾンを温度感受性複製ベクターpKO403に挿入し、プロトタイプとなるベクターpBFS37を構築した。また、105-A株由来の既知の恒常発現プロモーター P_{gap_Blo} をORF上流に挿入した *ISBlo11* の転移酵素遺伝子の発現カセットを構築し、pBFS37へのクローニングを行った。

ビフィズス菌プロモーターのレポーターアッセイ系の確立

我々の過去の研究(引用文献)で構築した105-A株の α -ガラクトシダーゼ欠損株(Δ *aga*株)を宿主株として、 α -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子*aga*のORFをレポーター遺伝子としたレポータープラスミドpBFS45-3を構築した。また大腸の α -ガラクトシダーゼ欠損株である Δ *melA*株を国立遺伝学研究所のKeioコレクションから入手した。ビフィズス菌由来の7種類のプロモーター領域をそれぞれpBFS45-3の*aga* ORFの上流に連結し、これら2種類の宿主株に導入することにより得られた株について、1/2 MRS培地(ビフィズス菌)およびLB培地(大腸菌)を用いて培養を行った。得られた菌体から粗酵素溶液を調製し、 α -ガラクトシダーゼ活性を測定することにより、プロモーター活性の評価を行った。

2段階の形質転換によるトランスポゾン変異導入系の確立

の解析で同定されたキシロースによる強力な発現誘導が可能なプロモーター $P_{fruEKFGBlo}$ を転移酵素ORFの上流に連結し、温度感受性複製ベクターpKO403にクローニングすることにより、転移酵素発現ベクターpBFS100を構築した。また、ビフィズス菌選

担マーカーであるスペクチノマイシン耐性遺伝子を持つ大腸菌 ColE1 レプリコンに、IS*Blo11* の両末端の IR を連結したトランスポゾンベクター-pBFS12 を構築した。転移を達成するために、まず 105-A 株に転移酵素発現ベクターを導入し、4%キシロース含有 1/2 MRS 培地を用いて発現誘導を行って転移酵素を十分に供給したコンピテント細胞を作成した。このコンピテント細胞に、トランスポゾンベクターを導入するという二段階の形質転換で転移を誘導した。スペクチノマイシン含有 1/2 MRS 寒天培地を用いてトランスポゾン変異導入株の選抜を行い、得られた株におけるトランスポゾンの挿入領域を PCR 増幅等の方法で増幅し、挿入部位の塩基配列を決定した。

(3) 新たな転移因子を用いたトランスポゾン変異導入系の検討

他菌種の INSeq 解析に用いられている *mariner* 型トランスポゾン Himar1C9 を入手し、それをビフィズス菌で機能するように改変を行った。

(2) と同様に、温度感受性ベクター-pKO403 に Himar1C9 の転移酵素発現カセットを搭載した転移酵素発現ベクター-pBFN114 と、Himar1C9 の IR の間にスペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入したトランスポゾンを持つトランスポゾンベクター-pBFS68 を構築した。転移の誘導およびトランスポゾン変異株の選抜と挿入部位の検証は(2) と同様に行った。

4. 研究成果

(1) *Bifidobacterium longum* 105-A 株の完全長ゲノム配列の決定

トランスポゾン変異導入を進めるにあたり、トランスポゾンのゲノムへの転移の特徴(挿入部位のランダム性など)を評価するには、宿主株の完全長のゲノム配列が必要である。そこで、長鎖 DNA 配列の決定が可能な次世代シーケンサー PacBio RSII を用いて、105-A 株のゲノム配列解析を行った。その結果、105-A 株の完全長ゲノム配列を決定することが出来た (GenBank accession no. AP014658)。ゲノムサイズは 2,290,145 bp であり、1,878 ORF, 56 tRNA 遺伝子, 1 tmRNA 遺伝子および 4 rRNA オペロンが同定された。同種の代表株である *B. longum* NCC2705 株のゲノムと比較すると、ORF 数が 150 多く、またゲノムサイズも 33.5 kbp 程度大きなゲノムを持っていた。この完全長ゲノム配列が決定されたことにより、トランスポゾンの挿入部位の同定が可能になった。

(2) IS*Blo11* を用いたトランスポゾン変異導入系の確立

トランスポゾン変異導入ベクターの構築
IS*Blo11* を元に構築したトランスポゾンを含むプロトタイプベクター-pBFS37 を構築した。続いて、転移の活性を上昇させ、効率の良いトランスポゾン変異導入を可能にするために、IS*Blo11* の転移酵素遺伝子を高発現させることを計画した。

105-A 株由来の恒常発現型プロモーター P_{gap_Blo} を連結した IS*Blo11* の転移酵素遺伝子の発現カセットを構築し、pBFS37 へのクローニングを試みた。しかし、転移酵素遺伝子への変異が頻出し、設計通りのプラスミドを構築することが出来なかった。原因を考えたところ、大腸菌内で P_{gap_Blo} が機能し、大腸菌細胞内で転移酵素が発現したことが問題と考えられた。このため、転移酵素を高発現させる系を構築するためには、大腸菌では機能せず、ビフィズス菌内では高発現が可能なプロモーターが必要であると推察された。

ビフィズス菌プロモーターのレポーターアッセイ系の確立

で必要と考えられたプロモーターを同定するために、プロモーター活性を大腸菌及びビフィズス菌で評価できるレポーターアッセイ系を構築した。この系は α -ガラクトシダーゼ欠損株 (大腸菌 $\Delta melA$ 株およびビフィズス菌 105-A 株由来 Δaga 株) を宿主株として、ベクター-pBFS45-3 上に連結された 105-A 株の α -ガラクトシダーゼ遺伝子 *aga* をレポーター遺伝子として、 α -ガラクトシダーゼ活性の測定によりプロモーター活性を評価する系である。

本アッセイ系を用いて、ビフィズス菌由来の 7 種類のプロモーターの活性を評価したところ、3 種類のプロモーター (P_{xfp_Blo} , P_{xfp_Bbr} , $P_{fruEKFGBlo}$) は、LB 培地で培養した大腸菌内でほとんど活性を示さなかった (表 1)。これに対して P_{gap_Blo} のベクター構築に用いられた P_{gap_Blo} は大腸菌内で高い活性を示し、 P_{gap_Blo} の推察を裏付ける結果となった。1% グルコースを含む 1/2 MRS 培地で培養したビフィズス菌内では、 P_{xfp_Blo} および P_{xfp_Bbr} は、 P_{gap_Blo} と同等程度の活性を示した。一方 $P_{fruEKFGBlo}$ は 1% グルコース存在下ではほとんど活性を示さなかったが、4% キシロース存在下では、1% グルコース存在下での P_{gap_Blo} の活性の約 3.3 倍の活性を示し、キシロースによる強い発現誘導が可能と考えられた (表 1)。これら 3 種類のプロモーターが大腸菌では活性をほとんど示さず、ビフィズス菌では高い活性を示したことから、これらのプロモーターは転移酵素遺伝子の高発現に適したプロモーターと考えられた。

表 1. *B. longum* 105-A および大腸菌におけるピフィズス菌プロモーターの活性

プロモーター	培地	α-Gal 比活性 ($\mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg protein}]^{-1}$)	
		105-A Δ aga (1/2MRS 培地)	大腸菌 Δ melA (LB 培地)
なし	1% グルコース	0.01 ± 0.00	0.13 ± 0.02
P_{gap_Blo}	"	2.48 ± 0.48	10.04 ± 0.15
P_{scrP_Blo}	"	0.31 ± 0.04	8.52 ± 0.37
P_{xfp_Blo}	"	1.53 ± 0.36	0.40 ± 0.04
$P_{fruEKFG_Blo}$	"	0.08 ± 0.03	0.78 ± 0.03
"	4% キシロース	8.09 ± 0.81	-
P_{cscBA_Blo}	1% グルコース	0.02 ± 0.01	32.85 ± 1.75
P_{scrP_Ban}	"	0.05 ± 0.02	8.41 ± 0.35
P_{xfp_Bbr}	"	2.10 ± 0.28	0.17 ± 0.02

2 段階の形質転換によるトランスポゾン変異導入系の確立

で同定した, キシロースによる強力な発現誘導が可能なプロモーター $P_{fruEKFG_Blo}$ を転移酵素 ORF の上流に連結し, 転移酵素発現ベクター pBFS100 を構築した. pBFS100 はピフィズス菌内で複製可能なシャトルベクターであり, 4%キシロース存在下で転移酵素を高発現可能なベクターである. これらの性質から, 転移酵素を安定して供給することが可能であると期待された.

さらに, トランスポゾンベクター pBFS12 を構築した. pBFS12 はプラスミド全体を IR と IR の間に挟み込み, IR 同士を連結して環状化させた構造となっており, プラスミド全体でトランスポゾンとして機能する. この構造は IS*Blo11* が属する IS3 ファミリーの挿入配列の転移の中間体の構造を模したものであり, この中間体の構造が転移酵素に認識されやすいことが知られていることから, 転移効率の上昇が期待された. また pBFS12 はピフィズス菌内で複製できないベクターであるため, ベクターにコードされているスペクチノマイシン耐性遺伝子を用いて, トランスポゾンの転移が行った株のみを選抜することが可能であると考えられた.

実際の転移の誘導は, 2 段階の形質転換試験により行った. まず 1 段階目として, 105-A 株に pBFS100 を導入し, 転移酵素発現株 105-A/pBFS100 株を得た. 本株を 4%キシロース添加 1/2 MRS 培地で培養し, 転移酵素を発現させたコンピテント細胞を作製した. このコンピテント細胞に pBFS12 を 2 段階目の形質転換として導入した. その結果, 1,000 cfu/ μg pBFS12 DNA という非常に高い効率でトランスポゾン変異株を作出することができた. 得られた変異株のゲノムへのトランスポゾンの挿入部位の塩基配列を解析した結果, pBFS12 はランダムな 3~4 塩基を認識して転移しており, 様々なゲノムの部位に挿入されていた. しかしながら, 遺伝子内部よりも遺伝子間領域への挿入が多い傾向が観察された.

(3) 新たな転移因子を用いたトランスポゾン変異導入系の検討

(2)の結果を受けて, IS*Blo11* とは異なる転移因子を用いたトランスポゾン変異導入系についても, 構築する方が望ましいと考えられた. そこで, 他菌種の INSeq 解析に用いられている *mariner* 型トランスポゾン Himar1C9 を入手し, それを元にトランスポゾン変異導入系の構築を試みた.

基本的な系の構築は, (2) の 2 段階の形質転換による変異導入系の構築に従って行った. まず温度感受性ベクター pKO403 に Himar1C9 の転移酵素発現力セット (プロモーター: $P_{fruEKFG_Blo}$) を搭載した転移酵素発現ベクター pBFN114 と, Himar1C9 の IR の間にスペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入したトランスポゾンを持つトランスポゾンベクター pBFS68 を構築した. 105-A 株に pBFN114 を導入した 105-A/pBFN114 株を作製したのち, 同株を培養し, キシロースによる転移酵素遺伝子の発現誘導により細胞内に転移酵素を蓄積させたコンピテント細胞を作成し, 2 段階目の形質転換として pBFS68 を導入し, トランスポゾン変異株をスペクチノマイシン耐性により選抜した. この結果, 50~200 cfu/ μg pBFS68 DNA の効率でトランスポゾン変異株を取得することが出来た.

トランスポゾン挿入部位の塩基配列を解析したところ, 挿入部位は多様であり, その多くが遺伝子の内部に挿入されていたことから, Himar1C9 を用いて, INSeq 法に適したトランスポゾン変異導入系を確立できたと言える. 本研究で確立した系を用いて, 現在トランスポゾン変異株ライブラリーの構築を進めている.

研究期間全体を通して, ピフィズス菌において 2 種類のトランスポゾン変異導入系を確立することが出来た. このような系の確立はピフィズス菌ではほとんど報告が無く, 今後の応用が期待できる. また, 宿主株である *B. longum* 105-A 株の完全長ゲノム配列を決定することが出来た. このように, INSeq 法による腸内生存に寄与するピフィズス菌遺伝子の同定に必要な基盤を本研究で整備することが出来た. 今後の研究で実際に遺伝子の同定を進め, ピフィズス菌の腸内での生存のメカニズムを明らかにする.

< 引用文献 >

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 α -galactosidase gene for raffinose assimilation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 4984-4994 (2012).

Fukiya, S., Sugiyama, T., Kano, Y., and Yokota, A. Characterization of an insertion

sequence-like element IS*Blo15* identified in a size-increased cryptic plasmid pBK283 harbored in *Bifidobacterium longum* BK28. **J. Biosci. Bioeng.**, 110: 141-146 (2010).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

吹谷 智. ピフィズ菌における実用的な遺伝子変異導入系の開発 生物学奨励賞(斎藤賞)受賞論文. **生物工学会誌**, 94(3): 110-116 (2016). 査読有

Sakanaka, M., Fukiya, S., Kobayashi, R., Abe, A., Hirayama, Y., Kano, Y., Yokota, A. Isolation and transposition properties of IS*Blo11*, an active insertion sequence belonging to the IS3 family, from *Bifidobacterium longum* 105-A. **FEMS Microbiol Lett.**, 362(7): fnv032 (2015). doi: 10.1093/femsle/fnv032. 査読有

Kanesaki, Y., Masutani, H., Sakanaka, M., Shiwa, Y., Fujisawa, T., Nakamura, Y., Yokota, A., Fukiya, S., Suzuki, T., Yoshikawa, H. Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* 105-A, a strain with high transformation efficiency. **Genome Announc.**, 2: e01311-14 (2014). doi:10.1128/genomeA.01311-14. 査読有

Sakanaka, M., Tamai, S., Hirayama, Y., Onodera, A., Koguchi, H., Kano, Y., Yokota, A., Fukiya, S. Functional analysis of bifidobacterial promoters in *Bifidobacterium longum* and *Escherichia coli* using the α -galactosidase gene as a reporter. **J. Biosci. Bioeng.**, 118(5): 489-495 (2014). 査読有

〔学会発表〕(計11件)

中川路 伸吾, 阪中 幹祥, 横田 篤, 吹谷 智. トランスポゾン変異導入系を用いたピフィズ菌の腸内生存に寄与する遺伝子の探索系の構築. 第10回日本ゲノム微生物学会年会, 2016年3月4日, 東京工業大学 大岡山キャンパス(東京都目黒区).

吹谷 智. ピフィズ菌における実用的な遺伝子変異導入系の開発 生物学奨励賞(斎藤賞)受賞講演. 第67回日本生物工学会大会, 2015年10月27日, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)招待講演.

中川路伸吾, 阪中 幹祥, 横田 篤, 吹谷 智. INSeq 法を用いた腸内生存に寄与するピフィズ菌遺伝子の探索系の構築. 日本乳酸菌学会 2015 年度大会, 2015 年 7 月 11 日, 和洋女子大学(千葉県市川市).

阪中 幹祥, 横田 篤, 吹谷 智. IS3 family 挿入配列 IS*Blo11* を用いたピフィズ菌のトランスポゾン変異導入系の確立. 第9回日本

ゲノム微生物学会年会, 2015年3月6日, 神戸大学神大会館(兵庫県神戸市)

Mikiyasu Sakanaka, Saki Tamai, Yosuke Hirayama, Atsushi Yokota and Satoru Fukiya. Identification of bifidobacterial promoters that are suitable for transposon mutagenesis in bifidobacteria. The 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria, September 2nd, 2014, Egmond aan Zee (The Netherlands).

阪中 幹祥, 玉井 早紀, 平山 洋佑, 横田 篤, 吹谷 智. 大腸菌低活性型のピフィズ菌プロモーターの同定およびトランスポゾン変異導入系への応用. 日本乳酸菌学会 2014 年度大会, 2014 年 7 月 17 日, メルパルク広島(広島県広島市).

阪中 幹祥, 玉井 早紀, 平山 洋佑, 横田 篤, 吹谷 智. 大腸菌および *Bifidobacterium longum* におけるピフィズ菌プロモーターの機能解析. 第8回日本ゲノム微生物学会年会, 2014年3月8日, 東京農業大学(東京都世田谷区).

〔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・講師
研究者番号: 10370157

(2) 研究分担者

小椋 義俊 (OGURA, Yoshitoshi)

九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 40363585

(3) 連携研究者

なし