

令和元年5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04893

研究課題名(和文) 腸内細菌叢存在下でのビフィズス菌の腸内活動に重要な遺伝子の同定と機能検証

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of genes important for the activity of bifidobacteria in the intestine harboring intestinal microbiota

研究代表者

吹谷 智 (Fukiya, Satoru)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：10370157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：健康に有用な腸内細菌として知られるビフィズス菌が腸内でどのように活動しているのかについて、分子レベルでの機構を明らかにするために、まず通常飼育マウス腸内でヒト由来ビフィズス菌の長期定着が可能な飼育試験系を確立した。この系を用いて、腸内特異的に発現する遺伝子を薬剤耐性の変化により検出するR-IVET法による解析を行い、腸内特異的に発現する遺伝子を同定した。さらに、48,000株からなるビフィズス菌のトランスポゾン変異株集団を構築して無菌マウスに投与し、各変異株の腸内での増減をINSeq法により包括的に評価した結果、腸内での生存と定着に重要と考えられる442個の遺伝子を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、R-IVET法とINSeq法という分子生物学的な手法を駆使して、腸内で特異的に発現する遺伝子および腸内での生存・定着に重要なビフィズス菌遺伝子を多数同定することができた。この成果は、ビフィズス菌が腸内でどのようなメカニズムで活動し、健康に有用な効果を発揮しているのかというビフィズス菌研究の根源的な問いに答える端緒となるものである。また、高齢化によって腸内での菌数が減少することが知られているビフィズス菌をどのようにして維持し、健康維持につなげるのか、その方策の基盤となる情報を得られたという点で、社会的にも重要な研究であると評価することができる。

研究成果の概要(英文)：Bifidobacteria are well-known for their beneficial effects on human health, but the molecular mechanisms how bifidobacteria are colonizing and surviving in the intestine are not fully understood especially in the presence of the intestinal microbiota. To clarify the molecular mechanisms, the breeding system of the conventional mice that allows long-term colonization of the human-derived bifidobacteria was established. Using this system, bifidobacterial genes specifically expressed in the intestine were identified by R-IVET analysis. Furthermore, a transposon mutant library comprising 48,000 mutants was constructed and administered to the germ-free mice. Increase and decrease of each mutant in the intestine were comprehensively evaluated by the INSeq analysis. Finally, 442 genes were identified that were important to the colonization and survival in the intestine.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ビフィズス菌 腸内活動 INSeq法 R-IVET 腸内細菌叢 腸管定着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビフィズス菌は通常数十兆個もの腸内細菌が存在する腸内細菌叢の中で定着し、代謝を行い、生存することにより、様々な健康有用効果を発揮している。しかし、このようなビフィズス菌の実際の腸内での活動の分子機構については明らかにされておらず、ビフィズス菌研究の重要な課題として残されたままである。この分子機構を解明するためには、まず「腸内活動にどのような遺伝子が重要なのか」を明らかにする必要がある(図1)。しかし、腸内細菌叢の中の特定の菌種について、腸内での遺伝子発現や、各遺伝子の腸内生存への寄与を網羅的に評価することは、遺伝子操作技術の開発が不十分であったため、未だ誰も達成できていなかった。

そこで我々は、科学研究費助成の成果として、ヒト由来ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* 105-A 株 (以下 105-A 株) を用いて、まずビフィズス菌では困難とされた遺伝子への欠失変異導入系およびトランスポゾン変異導入系の開発に成功した^{(1), (2)}。さらにこれらを基に、腸内特異的に発現する遺伝子を薬剤耐性の変化により検出する R-IVET (Recombinase-based *in vivo* expression technology) 法と、トランスポゾン変異株集団の腸内での増減を次世代シーケンシングにより包括的に評価する INSeq (Insertion-Sequencing) 法というビフィズス菌では応用例のない網羅的な解析手法の確立を進めた。これらの手法を用いることで、腸内で特異的に発現し、かつ腸内での生存に寄与する遺伝子、すなわち「腸内活動に重要な遺伝子」を初めて明らかにすることができる(図1)。

しかしこの解明を進めるためには、ヒト由来のビフィズス菌を、固有の腸内細菌叢を持つ通常飼育マウスに定着させる飼育試験系が必要である。一般にはビフィズス菌を無菌マウスに単独で定着させたモデル系が頻用されるために、通常飼育マウスへの定着はあまり検討されてこなかった。しかしヒト由来 *Bifidobacterium breve* が資化できる糖質の餌への添加により、同種の株が通常飼育マウスに定着することが報告された⁽³⁾。このことは、食餌の検討により、外来性のビフィズス菌であってもマウスに定着が可能であることを示している。したがって、105-A 株の増殖促進効果が高い糖質を選抜し、摂取・投与条件を検討することにより、105-A 株が定着可能な飼育試験系を確立することは、十分可能であると考えられた。

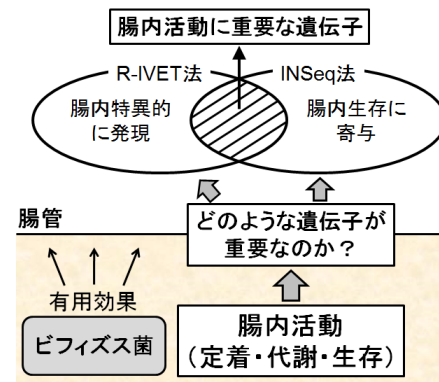


図1. 腸内活動に重要な遺伝子の同定

2. 研究の目的

上記の背景から本研究では、105-A 株が通常飼育マウスの腸内に定着可能な飼育試験系を確立する。この系を用いて、独自に開発した遺伝子操作技術を応用し、腸内での遺伝子発現および腸内生存への寄与を解析するための網羅的な手法である R-IVET 法と INSeq 法を用いた解析を組み合わせることで、腸内細菌叢内でのビフィズス菌の活動に重要な遺伝子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *B. longum* 105-A 株の通常飼育マウスへの投与試験

105-A 株の定着を可能にする糖質の *in vitro* 培養での選抜

105-A 株を 12 種類の糖を各々単一炭水化物源とした 1/2MRSCS (Cysteine-Sodium Ascorbate) 液体培地で 37°C 24 時間嫌気培養し、グルコースを単一炭水化物源とした場合との生育量 (OD₆₆₀) を比較して、グルコースの場合と同等の生育量を示す糖質を選抜した。

105-A 株の定着が可能なマウス飼育試験条件の検討

7 週齢の BALB/c 雌マウスを、AIN-93G 準拠精製飼料を与えた対照群と、選抜された 3 種類の糖質 (ラクトース、1-kestros、ラフィノース) を 3% または 6% となるように精製飼料に添加した食餌を与えた群に分け、クロラムフェニコール耐性を付与した 105-A 株 (10⁹ cfu) を経口投与した。投与開始から 24 時間毎に糞便を回収し、糞便希釈液をクロラムフェニコール含有 1/2MRSCS 寒天培地に塗抹して 37°C で 3 日間嫌気培養を行い、コロニー数から投与株の生菌数を算出し、105-A 株の腸内での定着を評価した。またマウス盲腸内容物を採取し、DNA を抽出後、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR で増幅し、Illumina MiSeq を用いた次世代シーケンシングに供した。得られたデータについて Qiime を用いて解析し、各飼育条件下での腸内細菌叢構造を比較した。

(2) *Himar1C9* を用いたトランスポゾン変異株ライブラリーの構築と拡張

転移因子 *Himar1C9* の転移酵素遺伝子を含むビフィズス菌で複製可能なベクターを 105-A 株に導入し、4% キシロース存在下で培養することで転移酵素の発現を誘導した。この菌体に「転移酵素の標的配列である逆位反復配列 (Inverted Repeat, IR) にスペクチノマイシン耐性遺伝子 (Sp^R) が挟まれたトランスポゾン (IR-Sp^R-IR)」を含むビフィズス菌で複製されないベクターを導入し、スペクチノマイシン含有 1/2MRSCS 寒天培地で IR-Sp^R-IR が 105-A 株のゲノム上に転移したトランスポゾン変異株を選抜した。

(3) INSeq 解析

(2)に記載した方法で構築したトランスポゾン変異株ライブラリー（48,000 変異株）およびマウス投与後の盲腸内容物から DNA を抽出後、トランスポゾンに隣接する 105-A 株由来の配列を特異的に増幅・精製し、Illumina MiSeq に供した。得られた大量の塩基配列から、シェルスクリプトを用いた文字列処理を行って 105-A 株由来の配列のみを抽出後、Bowtie を用いてゲノムへのマッピングを行った。得られたマッピングデータを、Himar1 転移部位解析用ソフトウェア TRANSIT⁴⁾を用いて解析し、各変異株の変異部位の特定と相対数の計測を行った。

(4) *B. longum* 105-A 株の無菌マウスへの投与試験

5 週齢の BALB/c 無菌マウスを 13 日間予備飼育後、(2)で構築したトランスポゾン変異株ライブラリー 10^9 cfu 相当を投与した。食餌としては予備飼育、本飼育ともに γ 線滅菌した固形飼料を使用し、自由摂取とした。また、飼育は飼育用ビニールアイソレーターを用いて 5 匹/1 ケージで行った。1 週間の本飼育終了後に腸管を摘出して盲腸内容物を取得し、INSeq 解析に供した。

(5) R-IVET 法を用いた解析

loxP-Sp^R-loxP 配列を染色体上に導入した 105-A 株を宿主として、Cre recombinase ORF 上流に 105-A 株のゲノム DNA 断片をランダムにクローニングしたゲノムライブラリーを導入し、R-IVET ライブラリーを構築した。得られたライブラリーを固形飼料を与えて飼育したマウスおよび (1)の で同定した 1-ケストースを 6% 添加した精製飼料 (AIN-93G 準拠) を与えた BALB/c マウスに投与した。では 105-A 株がマウス腸管に定着しない条件であるため、投与から 3 時間後および 12 時間後に糞便を回収した。では 105-A 株がマウス腸管に定着できる条件であるため、投与から 4 日後に糞便を回収した。糞便を回収後・懸濁後、すぐにクロラムフェニコール含有 1/2 MRSCS 寒天培地に塗布し、³⁷ ℃、嫌気条件下で培養し、投与した R-IVET ライブラリー由来の株を選抜した。さらに、腸管特異的な遺伝子発現により Sp^R が染色体上から除去された株をスペクチノマイシン含有 1/2MRSCS 寒天培地上の生育を評価することにより選抜した。選抜された株でクローン化されたゲノム DNA 断片の塩基配列を決定し、105-A 株のゲノム情報を参照することで、消化管内で特異的に発現する遺伝子を同定した。

4. 研究成果

(1) *B. longum* 105-A 株の通常飼育マウスへの投与試験

ビフィズス菌増殖促進効果が知られているラフィノース、1-ケストース、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖に加えて、それらの構成糖であるガラクトース、フルクトースなどの単糖、およびラクトースなどの二糖を炭水化物源として、改変 1/2 MRSCS 液体培地を調製し、105-A 株の生育を経時的な濁度測定により評価した。その結果、ラフィノース、ラクトース、1-ケストースがグルコースを炭水化物源とした場合と同等の生育を示した。これらの結果から、マウスの食餌へ添加する糖質の候補として、ラフィノースおよび 1-ケストースを選出した。これらの糖質を精製飼料に添加してマウスに与えたところ、ラフィノース 6% および 1-ケストース 6% 添加食群において、 10^6 cfu/g 糞便以上の生菌数が 2 週間維持され、105-A 株のマウス腸内への定着に対する有効性が観察された。マウス盲腸内のメタ 16S 腸内細菌叢解析の結果から、マウス内在性のビフィズス菌 *Bifidobacterium pseudolongum* の増殖が観察されなかった 1-ケストース 6% 添加食が、105-A 株のマウス腸内への定着に最も有効であると考えられた。これらの結果から、105-A 株の通常飼育マウス腸内への定着が可能な飼育試験系を確立することができた。

(2) Himar1C9 を用いたトランスポゾン変異株ライブラリーの構築と拡張

105-A 株への Himar1C9 トランスポゾン変異導入試験を繰り返し行い、トランスポゾン変異株ライブラリーを計 48,000 株に拡張した。このライブラリーについて INSeq 解析を行い、変異部位を同定し、変異株集団の構成を評価したところ、105-A 株の全遺伝子の 76.2% に変異が導入されていることが明らかになった。この結果から、105-A 株のゲノム上の遺伝子に網羅的に変異が導入されたライブラリーが構築できたと判断した。

(3) *B. longum* 105-A 株の無菌マウスへの投与試験と INSeq 解析

(2)で得られた約 48,000 株の 105-A 株トランスポゾン変異株ライブラリーを用いて、無菌マウスへの投与試験を行った ($n = 5$)。得られた盲腸内容物サンプルから DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた INSeq 解析を行った。データ解析は定量および統計学的な評価が可能なソフトウェア TRANSIT を導入して行った。得られた各変異株の相対数データを投与前のライブラリーの各変異株の相対数データと比較したところ、消化管における生存と定着に寄与すると考えられる 442 個の遺伝子を同定することができた。この中には機能未知の遺伝子が 15.8% 含まれていたことから、INSeq 法の導入により、遺伝子の推定機能に依存せずに、消化管における生存と定着に寄与する遺伝子を同定することができたと考えられる。

(4) R-IVET 法を用いた解析

固形飼料を与えた通常飼育マウスへの R-IVET ライブラリーの投与試験を行い,マウス消化管特異的に発現すると考えられる 35 個の遺伝子を同定した。(1)で確立した 1-ケストースを 6% 添加した精製飼料を与え, 105-A 株がマウス消化管内に定着できる条件で同様に R-IVET ライブラリーの投与試験を行い,マウス消化管特異的に発現すると考えられる 45 個の遺伝子を同定した。同定された遺伝子の中にはすでに消化管での発現誘導が報告されている遺伝子や定着に關与する遺伝子, 各回の試験で重複して同定される遺伝子が存在していた。これらの結果から, (1)で確立した 105-A 株の腸内定着の系を用いて, R-IVET 法により腸内特異的に発現する遺伝子を同定する手法が有効であることが示された。

〔参考文献〕

- 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).
- 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: fnv032 (2015). doi: 10.1093/femsle/fnv032.
- O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Leahy, S.C., Reunanen, J., Bottacini, F., Claesson, M.J., O'Brien, F., Flynn, K., Casey, P.G., Munoz, J.A.M., Kearney, B., Houston, A.M., O'Mahony, C., Higgins, D.G., Shanahan, F., Palva, A., de Vos, W.M., Fitzgerald, G.F., Ventura, M., O'Toole, P.W., van Sinderen, D. Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 108: 11217-11222 (2011). doi:10.1073/pnas.1105380108.
- DeJesus, M.A., Ambadipudi, C., Baker, R., Sasseti, C., Ioerger, T.R. TRANSIT--A Software Tool for *Himar1* TnSeq Analysis. **PLoS Comput. Biol.**, 11: e1004401 (2015). doi: 10.1371/journal.pcbi.1004401.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- Sakanaka, M., Nakakawaji, S., Nakajima, S., Fukiya, S., Abe, A., Saburi, W., Mori, H., Yokota, A. A transposon mutagenesis system for *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* based on an IS3 family insertion sequence, IS*Blo11*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 84(5): e00824-18 (2018). DOI: 10.1128/AEM.00824-18. 査読有
- 吹谷 智, 横田 篤. 腸内細菌の機能理解に向けて: ビフィズス菌における遺伝子操作系の開発. **化学と生物**, 55(9): 637-643 (2017). 査読無

〔学会発表〕(計 13 件)

- 中島 森, 久保勇貴, 中川路伸吾, 阪中幹祥, 小椋 義俊, 吉本 真, 吉田圭佑, 清水 (肖) 金忠, 小田巻俊孝, 林 哲也, 横田 篤, 吹谷 智. ビフィズス菌の腸内生存・定着機構の解明に向けた INSeq 法の確立とその評価. 日本乳酸菌学会 2018 年度大会 (2018).
- 嶋田みな, 川瀬陽平, 園山 慶, 小椋 義俊, 林 哲也, 横田 篤, 吹谷 智. ヒト由来ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* 105-A が 通常飼育マウス腸内に定着可能な飼育試験系の確立. 日本乳酸菌学会 2018 年度大会 (2018).
- 久保 勇貴, 中島 森, 中川路 伸吾, 阪中 幹祥, 小椋 義俊, 吉本 真, 吉田 圭佑, 清水 (肖) 金忠, 小田巻 俊孝, 林 哲也, 横田 篤, 吹谷 智. マウス腸内への定着に寄与するビフィズス菌遺伝子の網羅的同定に向けた INSeq 法の確立. 第 70 回日本生物工学会大会 (2018).
- 中島 森, 中川路 伸吾, 阪中 幹祥, 小椋 義俊, 林 哲也, 横田 篤, 吹谷 智. トランスポゾン変異株集団を用いたビフィズス菌の腸内生存戦略の解明手法の確立. 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会 (2018).
- 川瀬 陽平, 嶋田 みな, 園山 慶, 横田 篤, 吹谷 智. 腸内細菌叢存在下での遺伝子機能解析を志向したヒト由来ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* 105-A の通常飼育マウス腸内での長期定着飼育試験系の確立. 平成 29 年度日本農芸化学会北海道支部第 2 回講演会 (2017).
- 中島 森, 中川路 伸吾, 阪中 幹祥, 小椋 義俊, 林 哲也, 横田 篤, 吹谷 智. 消化管における生存と定着に寄与するビフィズス菌遺伝子の網羅的同定に向けた INSeq 法の確立. 第 69 回日本生物工学会大会 (2017).
- 中川路 伸吾, 中島 森, 阪中 幹祥, 小椋 義俊, 林 哲也, 横田 篤, 吹谷 智. 消化管における生存と定着に寄与するビフィズス菌遺伝子の探索系の構築. 日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017).
- 中川路 伸吾, 中島 森, 阪中 幹祥, 横田 篤, 吹谷 智. 腸内生存に寄与するビフィズス菌遺伝子の同定に向けた INSeq 法の確立. 2016 年度日本生物工学会 北日本支部 札幌シン

ポジウム (2016) .

Satoru Fukiya, Development of two gene-mutagenesis systems in *Bifidobacterium longum*. 5th Asian Federation of Societies for Lactic Acid Bacteria International Symposium (2016) 招待講演 . 石神 夏実, 河口 礼佳, 平等 清夏, 阪中 幹祥, 横田 篤, 吹谷 智 .R-IVET 法によるマウス消化管特異的に発現するビフィズス菌遺伝子の同定 . 第 68 回日本生物工学会大会 (2016) .

Satoru Fukiya, Development of practical gene-mutagenesis systems in *Bifidobacterium longum*. 4th International Symposium on Propionibacteria and Bifidobacteria (2016) 招待講演 .

吹谷 智 . ビフィズス菌の 2 つの遺伝子変異導入系の確立 : 標的遺伝子への欠失変異導入系とトランスポゾン変異導入系 . 日本農芸化学会 北海道支部第 1 回講演会 (2016) 招待講演 .

Satoru Fukiya. Development of practical gene-mutagenesis systems in bifidobacteria.

2016 KSBB Spring Meeting and International Symposium (2016) 招待講演 .

〔図書〕(計 2 件)

Fukiya, S., Sakanaka, M. Yokota, A. Genetic manipulation and gene modification technologies in bifidobacteria. *In: The bifidobacteria and related organisms: biology, taxonomy, applications.* Academic Press, London, UK (2017). pp. 243-259.

Kawasaki, S., Watanabe, M., Fukiya, S., Yokota, A. Stress responses of bifidobacteria: oxygen and bile acid as the stressors. *In: The bifidobacteria and related organisms: biology, taxonomy, applications.* Academic Press, London, UK (2017). pp. 131-143.

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 小椋 義俊

ローマ字氏名 : (OGURA, Yoshitoshi)

所属研究機関名 : 九州大学

部局名 : 大学院医学研究院

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 40363585

研究分担者氏名 : 園山 慶

ローマ字氏名 : (SONOYAMA, Kei)

所属研究機関名 : 北海道大学

部局名 : 大学院農学研究院

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 90241364

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。