

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292048

研究課題名(和文) ビフィズス菌-ヒト共生システムの理解を目指した系統的遺伝子破壊株の作製とその解析

研究課題名(英文) Construction and analyses of gene knock-out mutants collection of Bifidobacterium to understand Bifidobacterium-human symbiosis

研究代表者

鈴木 徹 (Suzuki, Tohru)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20235972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発したビフィズス菌の遺伝子破壊法を用い、ビフィズス菌の腸内環境に対する適応戦略に関わる可能性のある遺伝子群の系統的遺伝子破壊コレクションの作成を行った。ビフィズス菌の二成分制御系のレスポンスレギュレーター(RR)遺伝子9つの破壊株を取得し、そのトランスクリプトーム解析を行った。結果、一つのRR遺伝子が70個以上の遺伝子の発現調節に関与していることがあきらかになった。これらは、酸素耐性、酸耐性、胆汁酸耐性、浸透圧に関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：We have constructed a mutant collection of Bifidobacterium using the gene knock-out (KO) technique, that we have established previously. Nine response regulator genes of the two-component regulatory system were knocked out by double cross-over homologous recombination. Then, the transcriptome analyses were performed. As the result one gene KO showed over x4 or 1/4 change of the gene expression level in over 70 genes. These gene are thought to concern Oxgen stress, Acid and bile tolerance and osmotic shock resistance. Thus, we concluded that this gene should be a master switch gene of the symbiosis with animal gut in Bifidobacterium.

研究分野：応用微生物学

キーワード：微生物 腸内細菌 ビフィズス菌 腸内フローラ 遺伝子破壊 逆遺伝学 ミルクオリゴ糖 共生細菌

1. 研究開始当初の背景

(1) ビフィズス菌研究の重要性

ビフィズス菌(*Bifidobacterium* 属)は、動物の大腸下部に共生する細菌である。乳児において最優勢(10^{11} cfu/g)の菌種であり、離乳後も比較的高いレベル(10^9 - 10^{10} cfu/g)に保たれ、加齢とともに徐々に減少する。近年、便秘や下痢に対する整腸作用、花粉症などアレルギー症状の低減、大腸炎の緩和、感染症からの防御、ガンの発症抑制等、様々な本菌の健康促進作用が見いだされてきた。プロバイオティクスとして乳製品などに使われ広く消費者から支持されてきている。しかし、これらの分子機構が解明された例はまだ殆どなく、本菌の様々な健康増進効果を分子レベルで理解することは、乳児から高齢者まで、医薬にできるだけ頼らない健康な生活を守る上で大変重要な課題である。

(2) ビフィズス菌とヒトの共生戦略

ヒト母乳は、ミルクオリゴ糖(HMO)を多量に含む。しかし、乳児自身は資化できない。*B.infantis*, *B.breve* 等のある種のビフィズス菌は HMO を資化出来るため、乳児の腸管で優勢となる。その結果、乳児は病原菌からの抵抗性などの様々な利益を得ると考えられる。一方、成人になって優勢となる *B.adolescentis* は HMO 利用のための遺伝子群は全く持たず、代わりに海藻、コンニャクなどに特異的に含まれる特殊な多糖の分解系を有する。このように、ヒトとビフィズス菌は共進化し、本菌属が、乳児の健康と成人の雑食性を酵素系として担保していると考えられる。このことから、我々は、ビフィズス菌のオリゴ糖の代謝を解明する事は、ビフィズス菌とヒトとの相利共生戦略を理解する上で鍵となると考える。

(3) ビフィズス菌のゲノム研究

このような興味深い現象を理解するため、近年ビフィズス菌のゲノム解析が精力的に行われてきた。2002年ネスレ社が *B.longum* NCC2705 株、2006年に我々が *B.adolescentis* の全ゲノム配列を報告した。現在では12種、43株ビフィズス菌株の完全長ゲノム配列が決定されている。しかしながら、配列決定後の解析は十数種類の酵素が大腸菌で発現された程度であり、本格的なポストゲノム研究は進んでいない。また、ホモロジー解析の結果に付いても、40%以上の遺伝子が機能推定さえ出来ていない。生化学的な機能解析が行われている例は、ごく僅かである。その理由は、効率の良い遺伝子導入、遺伝子破壊の実験系が利用できなかったことに起因する。嫌気性菌は一般的に培養が難しい事もあり、こういった基本的技術の開発が進んでいないのが現状であった。

(4) ビフィズス菌のポストゲノム研究

我々は、こういった現状を打破することを目指し研究を展開し、マウスにおいて大腸菌 O-157 の感染死を *B.longum* が劇的に抑える現象を見だし、この現象はビフィズス菌が、

糖の代謝により大腸内に酢酸を放出する事によって起きている事をマルチオミクス解析により明らかにしてきた(福田・鈴木ら文献6, Nature 2011)。遺伝子破壊法は、本論文において結論を導く最も重要なデータを与えた。遺伝子破壊などの逆遺伝学的アプローチを可能にするためには、高効率な遺伝子導入法、温度感受性プラスミドの取得が不可欠であるが、我々は、世界に先がけこれらの開発を行ってきた。

しかし、ビフィズス菌の遺伝、生理、健康機能については、現段階では、まだほとんどが未解明であると言える。これらを、明らかにするためには、従来にない画期的な研究手法を用い、網羅的な探索手法を導入することが必要であると考えられる。

2. 研究の目的

鈴木(代表者)は、この問題をブレイクスルーするためにこれまでに、プラスミド人工修飾法(PAM法)による遺伝子組み換え効率の改善(Yasui et al. *Nucleic Acids Res*, 2009)。温度感受性プラスミドを用いた遺伝子破壊法の開発に成功し(Sakaguchi et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012)、これらの方法を組み合わせる事により、はじめて実用的な遺伝子破壊法をビフィズス菌において構築することが可能になった。これを利用し、ビフィズス菌とヒトとの共生に重要な役割を担うオリゴ糖代謝に関与すると推定される下記に示す糖の ABC トランスポータ、多糖分解酵素、遺伝子発現調節タンパク質を中心に遺伝子群約 200 遺伝子(全遺伝子の約 1 割)について破壊株の作成を目指す。得られた、多数の機能未知遺伝子破壊株の解析は従来の生化学的な逐次方法論は現実的ではない。今回は、変異株のトランスクリプトーム解析とメタボローム解析により、関連する糖質を特定した後、酵素学解析をハイスループットで行うパイプラインを構築する。

表 1. ゲノム中に存在する糖分解酵素遺伝子、調節遺伝子数の比較

カテゴリー	菌株			
	<i>B. longum</i> NCC2705	<i>B. adolescentis</i> ATCC15703	<i>L. johnsonii</i> NCC 533	<i>E. coli</i> K12-MG1655
ゲノムサイズ	2.25	2.08	1.99	4.64
多糖分解酵素	48	53	29	43
ABC トランスポータ	126	127	58	98
PTS システム	4	33	64	56
調節遺伝子				
<i>AraC/XylS</i>	1	3	4	21
<i>LysR</i>	5	1	5	45
<i>DeoR</i>	1	1	2	11
<i>Lacl</i>	22	19	7	15
<i>GntR</i>	1	1	0	3
<i>TetR</i>	9	5	6	11
<i>Lrp/AsnC</i>	1	2	0	3
<i>LuxR</i>	4	8	1	13
<i>MarR</i>	3	3	5	1
<i>MerR</i>	4	5	2	5
<i>IcIR</i>	4	1	0	8
計	55	49	32	136

対象とする遺伝子群

(1)多糖分解系 ビフィズス菌は、乳酸菌 *L. johnsonii* に比べ約 7 割も多い 48 個の多糖分

解遺伝子を持つ(表1)。これは、ピフィズス菌が棲息する大腸下部には難消化性のオリゴ等以外の炭水化物は、小腸で吸収され大腸まで到達できない。ピフィズス菌が持つ豊富な多糖分解酵素は、こういった難消化性の炭水化物を利用する事によって貧栄養の大腸下部における生育を可能にしていると考えられる。

(2)膜輸送系 能動輸送システムである ABC トランスポータ遺伝子は、127 個と 小腸に共生する *L. johnsonii* に比べ2.5 倍も多い(表1)。これは、ゲノムサイズが2 倍以上ある *E. coli* よりも30%多い値である。一方、グルーブ輸送(拡散)による PTS 系は僅か4 遺伝子で、*L. johnsonii* の60 個と比べ極端に少ない。大腸下部では各基質濃度が低い、PTS では十分ではなく、ATP のエネルギーを消費し、能動的に栄養成分を細胞内に取り込む必要性があるからではないかと、仮説を立てている。

(3) 遺伝子発現調節タンパク質 ピフィズス菌は大腸菌乳酸菌に比べ、ゲノム長当たりの調節タンパク質数が多く、特に LacI 型タンパク質の数が22 個と際立っている(表1)。ヒトの多様な食のバリエーションに効率よく対応するために個々の糖質に対し厳密な代謝の調節が必要だと考えられる。

本研究では、既に片山(Asakuma et al. JBC, 2011)、福田(Nature, 2011)が研究実績を有する糖質関連 ABC トランスポータから順次コレクションの作成と機能解析を行う。

3. 研究の方法

我々がこれまでピフィズス菌の新たな遺伝子操作法として開発してきた、プラスミド人工修飾法(PAM 法)と温度感受性プラスミドを用い、通常の実験者が2 週間程度の期間で確実に遂行できる実用的遺伝子破壊法の構築する。これを用いて、ミルクオリゴ糖の資化性ピフィズス菌 *B. longum* NCC2705 株及び、*B. longum* 105-A について、(1)遺伝子の破壊株コレクションの構築、(2)トランスクリプトーム解析、(3)メタボロミクス解析、(4)タンパク質化学的解析といった遺伝子破壊株コレクション用いた機能解析のパイプラインを構築し、ヒト・ミルクオリゴ糖を中心とした糖質関連 ABC トランスポータ遺伝子、オリゴ糖分解・代謝系遺伝子、およびこれらの調節遺伝子、計 200 遺伝子の破壊の対象として解析を行う事によりピフィズス菌-ヒト共生システムの分子機構の総合的理解を目指した。

4. 研究成果

(1) *B. longum* 105-A の全ゲノム解析
B. longum 105-A は、光岡らにより分離された株であり、非常に高い形質転換効率を示すことから多くの研究者により基礎研究に利用されている。しかし、その全ゲノム配列は公開されていなかった。我々は、東京農大兼崎らと共同しこの全塩基配列を解析した(図1)(雑誌論文)。

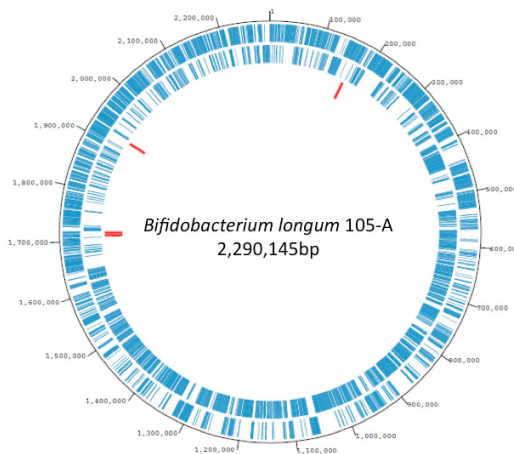


図 1. *B. longum* 105-A の全ゲノム配列

(2) *B. longum* NCC2705 株における双方向性マーカーを用いたマーカーレス遺伝子破壊
我々は、これまでに二重交差(DCO)による遺伝子破壊方法を確立してきた(Sakaguchi, et al., AMB, 2012)。しかし、複数の遺伝子が関わるシステムや、パラログ遺伝子が存在する場合には、連続して複数の遺伝子を破壊する必要がある。*pyrE* 遺伝子は、Uracil 要求性で選択すれば正の選択マーカーとして、5-FOA を用いれば負の選択マーカーとして使用できる。これを用いてマーカーレス遺伝子破壊法を構築した(雑誌論文) (図2)。その結果、出現したコロニーのうち7.7%が目的の破壊株となる非常に高効率の遺伝子破壊法を構築することに成功した(表2)。

マーカーレス遺伝子破壊法の概要

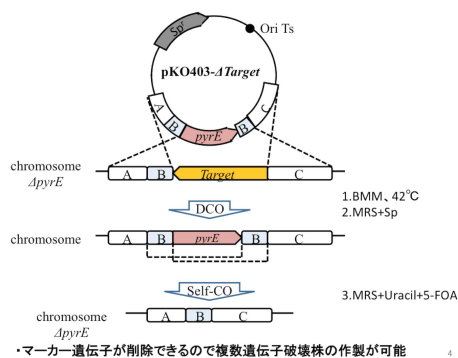


図 2. 双方向性マーカーを用いたマーカーレス遺伝子破壊法

表 2. *pyrE* を双方向性マーカーを用いたマーカーレス遺伝子破壊法の効率

破壊遺伝子	BL1646
形質転換効率	1.2×10 ⁴ CFU/μgDNA
DCOによるΔBL1646株獲得率	3/39(7.7%)
Self-CO率	6/7(86%)

(3) *B. longum* NCC2705 株における二成分制御系遺伝子の系統的破壊株コレクション

ホストへの定着には通常の遺伝子発現と異なる特別な遺伝子系の発現が必要であると予想される。これを明らかにするため、二成分制御系に特に注目し *B. longum* が持つすべての二成分制御系レスポンスレギュレータ遺伝子の破壊コレクションの構築を目指

した(図3)。現在までに、9つのレスポンスレギュレータのうち、8つの破壊株作成に成功した(表3)。今後、RNA Seqを用いて、これらによって調節される遺伝子群の解析を行う予定である。また、これらの変異株について、酸素耐性、酸耐性、胆汁酸耐性、浸透圧耐性について検討している。

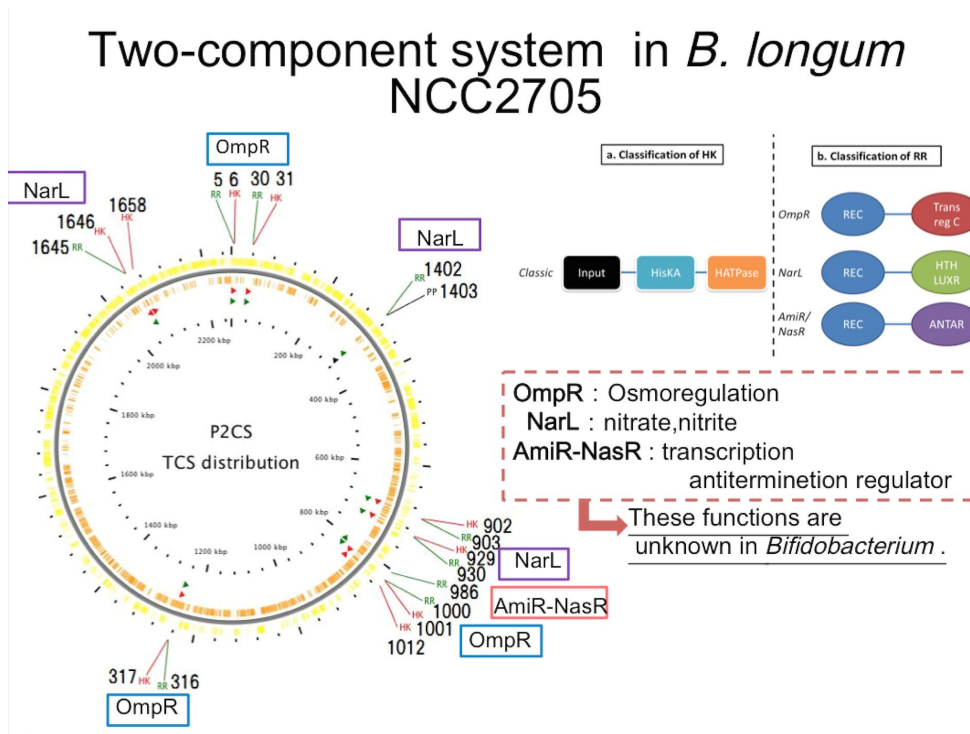


図 3. 破壊対象とした *B. longum* NCC2705 株二の成分制御系遺伝子群

表 3 二成分制御系遺伝子破壊実験の結果

Results of gene knockout

	Selection of Medium	Stable disruptant	Sequence and Southern hyb.	Undergoing project	
BL0005 [OmpR]	○	×	×	Switchable promoter	○ : successful × : fail
BL0030 [OmpR]	○	○	○	transcriptome	
BL0316 [OmpR]	○	○	×	confirm	
BL0903 [NarL]	○	○	○	transcriptome	
BL0930 [NarL]	×	×	×	Switchable promoter	
BL0986 [AmiR-NasR]	○	○	○	transcriptome	
BL1000 [OmpR]	○	○	○	transcriptome	
BL1402 [NarL]	○	○	×	confirm	
BL1645 [NarL]	○	○	×	confirm	

終わりに

今回の科研費を用いて、上記の研究を行うことができたことを感謝します。残念ながらまだ、研究の途上であるが、今回開発した高効率の実験系を有効に利用し、これからも、この研究を継続する所存である。今後は、多糖合成系遺伝子群と細胞接着遺伝子に範囲を広げ、ピフィズス菌の健康増進の分子メカニズムを明らかにすることを目指したい。当初目標とした200遺伝子を破壊するには及ばなかったが、二成分制御系に関しては、変異株コレクションの構築がほぼ完了した。今後は、これらのコレクションを用い、整腸効果、免疫賦活効果がなぜヒトごとに異なるかを明らかにし、近い将来、目的とする健康効果(整腸、免疫賦活 etc.)に対しヒトごと年齢ごとに異なる菌株を用意し食品として応用するテラームードプロバイオティクスが実用化されることが期待される。

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)

- Kanesaki Y, Masutani H, Sakanaka M, Shiwa Y, Fujisawa T, Nakamura Y, Yokota A, Fukiya S, Suzuki T, Yoshikawa H. (2014) Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium longum* 105-A, a Strain with High Transformation Efficiency. *Genome Announc.* 18;2(6). pii: e01311-14. doi: 10.1128/genomeA.01311-14. (査読なし)
- Sakaguchi K, Funaoka N, Tani S, Hobo A, Mitsunaga T, Kano Y, Suzuki T. (2013) The *pyrE* Gene as a Bidirectional Selection Marker in *Bifidobacterium longum* 105-A. *Biosci Microbiota Food Health.* 32(2):59-68. doi: 10.12938/bmfh.32.59. (査読あり)

[学会発表](計 6 件)

- 小酒井 智也、野村 泉、鈴木 徹 (2016/03/30) ピフィズス菌プロモーターの機能解析, 日本農芸科学会大会 (北海道・札幌市・札幌コンベンションセンター)
- 高橋 真裕子、滝口 裕加、野村 泉、鈴木

- 徹 (2015/03/27) *Bifidobacterium longum* NCC2705 株における線毛関連遺伝子の破壊 日本農芸科学会大会 (岡山県・岡山市・岡山大学津島キャンパス)
- 和泉 絢子、榎谷 尚慶、滝口 裕加、山中 祐二、坂口 広大、野村 泉、鈴木 徹 (2014/03/28) *Bifidobacterium longum* NCC2705 株における二成分制御系遺伝子の系統的破壊株コレクション 日本農芸化学会大会 (神奈川県・川崎市・明治大学生田キャンパス)
- 鈴木 徹、賀 建龍、坂口 広大 (2013/03/26) ピフィズス菌のリボゾーム結合部位の解析と翻訳効率の向上 日本農芸化学会大会 (宮城県・仙台市・東北大学河内北キャンパス)
- 榎谷尚慶、野村泉、鈴木徹 (2015/7/11) *Bifidobacterium longum* 105-A における遺伝子破壊法を用いて見出された新規多糖 合成遺伝子クラスター, 日本乳酸菌学会 (千葉県・市川市・和洋女子大学西館)
- 鈴木 徹、坂口広大、山中祐二、井上美有、野村泉 (2013/7/9) ピフィズス菌の調節遺伝子群の系統的遺伝子破壊株の作製の試み 乳酸菌学会札幌 (北海道・札幌市・北海道大学 学術交流会館)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

- 鈴木 徹 (SUZUKI TOHRU)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 20235972

(2) 研究分担者

- 片山 高嶺 (KATAYAMA TAKANE)
京都大学・生命科学研究科・教授
研究者番号: 70346104

(3) 研究分担者

- 福田 真嗣 (FUKUDA SHINJI)
慶応大学・政策・メディア研究科・特任准教授
研究者番号: 80435677