HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	挿入配列因子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開発［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	阪中, 幹祥
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11810号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58684
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Mikiyasu_Sakanaka_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）　　氏 名： 阪 中 幹 祥

学位論文題名

挿入配列因子 IS*Blo11* を用いたビフィズス菌のトランスポゾン変異導入系の開発
(Development of a transposon mutagenesis system
using the insertion sequence element IS*Blo11* in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*)

ビフィズス菌はヒトなどの宿主の腸管内に生息する細菌であり，宿主に健康増進効果を発揮することが広く知られている．しかしその一方で，ビフィズス菌の腸管定着および健康増進効果に関する分子機構は十分に解明されていない．この分子機構を解明するには，ビフィズス菌ゲノム上に存在する遺伝子の機能を解明する必要がある．しかし現在，遺伝子の機能を直接的に解析するために必要な遺伝子変異導入系，特にトランスポゾン変異導入系はビフィズス菌において十分に開発されていない．そこで本研究では，*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*（以下*B. longum*とする）のトランスポゾン変異導入系を開発することを目的とした．

1) ビフィズス菌由来の転移活性を有する挿入配列因子の単離と機能解析

トランスポゾン変異導入系は，宿主となる生物のゲノム上にトランスポゾンを転移させることにより，遺伝子に変異を導入する系である．このトランスポゾンとして，細菌の主要な転移因子の一種である挿入配列 (insertion sequence: IS) 因子がよく使用される．しかし，これまでビフィズス菌においては，IS 因子の転移に関する報告がほとんどなかったため，トランスポゾン変異導入に適する IS 因子は同定されていなかった．そこでまず，ビフィズス菌由来の転移活性を有する IS 因子を単離し，その機能を解明することを目的とした．

ビフィズス菌から転移活性を有する IS 因子を単離するために，枯草菌由来のレバンスクラーゼ遺伝子 *sacB* を対抗選択マーカーとして使用した．その結果，*sacB* 上に転移した *B. longum* 105-A 由来の IS 因子 IS*Blo11* を単離することに成功した．IS*Blo11* は IS*3* family に属しており，転移酵素 (transposase: Tpase) の認識部位となる逆位反復配列 (inverted repeat: IR) の間に 1 個の Tpase 遺伝子が挟まれた構造をしていた．続いて，IS*Blo11* 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構築し，そのトランスポゾンの機能（転移頻度および転移選択性など）を，大腸菌の F プラスミドの接合伝達を利用した評価系を用いて解析した．その結果，トランスポゾンは共通性のない 3 もしくは 4 bp を標的とし，約 10^{-5} の頻度で大腸菌 F プラスミドの様々な部位に転移することが明らかになった．以上の結果より，IS*Blo11* はトランスポゾン変異導入に適することが示唆された．

2) α-ガラクトシダーゼ遺伝子をレポーターとしたビフィズス菌および大腸菌におけるビフィズス菌プロモーターの機能解析

変異導入効率の高いトランスポゾン変異導入系を開発するためには，IS*Blo11* の Tpase 遺伝子をビフィズス菌内で高発現できるベクターを構築する必要がある．一方，DNA クローニング用の宿主である大腸菌内では，Tpase の発現によって Tpase 発現ベクターの構造が非常に不安定になることが示唆されていた．そこで，この問題を解決するために，大腸菌で活性が低く，*B. longum* で高い活性を示すビフィズス菌プロモーターを同定した．

α-ガラクトシダーゼ遺伝子の上流に，各種ビフィズス菌プロモーターを連結したベクター（計 7 種類）を構築した．これらのベクターを大腸菌および *B. longum* 105-A の α-ガラクトシダーゼ遺伝子欠失株に導入した．各培養菌体における α-ガラクトシダーゼ活性の測定により，プロモーターの活性を評価した．その結果，*xfp*（機能: D-キシルロース 5-リン酸／D-フルクトース 6-リン酸ホスホケトラーゼ）プロモーターと *fruEKFG*（機能: 糖質 ATP 結合カセット輸送体）プロモーターの大腸菌における活性は，他のプロモーターの活性と比較して 10 倍以上低かった．一方，*B. longum* では，*xfp* プロモーターはグルコース存在下で既知の高活性型プロモーターと同程度の活性を示した．また，*fruEKFG* プロモーターはフルクトース，キシロースまたはリボース存在下で，グルコース存在下での既知の高活性型プロモーターの活性よりも 1.1~3.4 倍高い活性を示した. 以上の結果より, *xfp* と *fruEKFG* プロモーターは Tpase 遺伝子の発現制御に適すると考えられた.

3) 挿入配列因子 IS*Blo11* を利用したビフィズス菌のトランスポゾン変異導入系の開発

IS*Blo11* の Tpase 遺伝子の翻訳開始点として 51ATG が *in silico* 解析により推定されている．しかし，実際には 51ATG 以外にも翻訳開始点の候補となる箇所が存在する（60ATG, 105ATG，159GTG など）．そこでまず，大腸菌 F プラスミドにおける Tpase の転移活性を指標として，Tpase 遺伝子の有力な翻訳開始点を選抜した．その結果，60ATG を翻訳開始点とする Tpase ($Tpase_{60}$) が最も高い転移活性を示したので，Tpase 遺伝子の有力な翻訳開始点として 60ATG を選抜した．また，51ATG を翻訳開始点とする Tpase ($Tpase_{51}$) の転移活性については再現性が低いため正確に評価できなかったが，上述の *in silico* 解析の結果を考慮に入れて，51ATG も Tpase 遺伝子の有力な翻訳開始点として選抜することにした．

上記で選抜したコドンを翻訳開始点とする Tpase 遺伝子を用いて，ビフィズス菌ゲノムへのトランスポゾン変異導入を試みた．まず，*fruEKFG* プロモーターの制御下で IS*Blo11* の Tpase（$Tpase_{51}$ または $Tpase_{60}$）を発現可能なシャトルベクターを大腸菌内で構築し，*B. longum* 105-A に導入した．次に，構築された 2 株に，IS*Blo11* の人工トランスポゾンサークル pBFS12（転移ベクター）を導入した．pBFS12 では，大腸菌レプリコンおよびスペクチノマイシン耐性遺伝子を含む領域の両末端に IS*Blo11* の IR が存在し, それらの IR が 3 bp のスペーサー領域を挟んで連結されている．この pBFS12 の構造は IS*3* family の IS 因子が転移する際に形成される中間体の構造と一致するので, pBFS12 の転移の反応は Tpase の作用により効率良く進行すると推察される．結果として，$Tpase_{51}$ および $Tpase_{60}$ の作用により pBFS12 がゲノム上に転移した *B. longum* 株をそれぞれ約 10^3 および約 10^2 CFU/μg DNA の効率で取得できた．$Tpase_{51}$ は $Tpase_{60}$ よりもビフィズス菌においては高い転移活性を示すと考えられた．また，pBFS12 は共通性のない 3 または 4 bp の塩基配列を標的として，ゲノム上の様々な部位に挿入されていた．これらの結果から, 本研究で開発した系により, *B. longum* ゲノムへのトランスポゾン変異導入が可能になったと結論付けられる.

以上のように，本研究では，転移活性を有する IS 因子 IS*Blo11* と IS*Blo11* の Tpase 遺伝子の発現制御に適するプロモーターを同定した．さらに，これらの因子を組み合わせて，*B. longum* ゲノムへのトランスポゾン変異導入に初めて成功した. 今回開発したトランスポゾン変異導入系は，変異導入効率が比較的高いので，他のビフィズス菌種においても応用可能であると考えられる．今後，このトランスポゾン変異導入系を用いて，ビフィズス菌の遺伝子の機能を明らかにすることにより，ビフィズス菌の腸管定着および健康増進効果に関する分子機構を解明できると期待される.