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_review.pdf，審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　　博士（農学）　　氏　名　　阪 中 幹 祥

審査担当者	主 査	教　授	横 田　篤
	副 査	教　授	小 林 泰 男
	副 査	教　授	内 藤　哲（生命科学院）
	副 査	准教授	和 田　大
	副 査	講　師	吹 谷　智

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*)

本論文は和文186ページ，表15，図12を含む5章から構成され，1編の参考論文が付されている．

腸内細菌の一種であるビフィズス菌はヒトの腸管に定着することにより，ヒトの健康に有益な効果をもたらすことが広く知られている．一方，ビフィズス菌の腸管定着や有益効果の分子機構については未解明な部分が多い．この分子機構を解明するためには，遺伝子変異導入系の利用が効果的であるが，本系はこれまでビフィズス菌では十分に確立されていなかった．本論文では，遺伝子変異導入系の主要な手法の一つであるトランスポゾン変異導入系の開発が*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*（以下*B. longum*）において試みられ，開発に至るまでに得られた実験結果がまとめられている．

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，細菌ゲノムの様々な部位にトランスポゾンを転移させて，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，細菌ゲノムに普遍的に存在する挿入配列 (IS) 因子がよく用いられる．しかし，これまでトランスポゾン変異導入に応用可能なビフィズス菌の IS 因子は同定されていなかった．本論文ではまず，転移活性を有する IS 因子をビフィズス菌から単離し，その機能を解析した結果を報告している．

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用いて IS 因子の単離が試みられ，その結果，*sacB* 領域に転移した IS 因子 IS*Blo11* を *B. longum* 105-A から単離することに成功している．IS*Blo11* には 1 つの転移酵素 (Tpase) 遺伝子がコードされており，その両末端には Tpase の認識部位である逆位反復配列が保存されていた．また，IS*Blo11* の転移能を大腸菌を用いて解析した結果，IS*Blo11* は比較的高い頻度で様々な部位に転移することが示されている．これらの結果から，IS*Blo11* はトランスポゾン変異導入に応用可能であると考察している．

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

トランスポゾン変異導入系の変異導入効率を向上させるためには，IS*Blo11* の Tpase 遺伝子を高発現可能なベクターが必要となる．一方で，DNA クローニング用の宿主である大腸菌内においては，Tpase が発現すると，Tpase 発現ベクターが構造的に不安定になることが示唆されていた．この問題を解決するために，大腸菌で活性が低く，ビフィズス菌で活性が高いビフィズス菌プロモーターの同定が行われている．

実際には，α-ガラクトシダーゼ遺伝子をレポーターとしたプロモーター活性測定系が構築され，大腸菌および *B. longum* における各種ビフィズス菌プロモーター（計 7 種類）の活性が評価されている．その結果，P_{xfp}（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遺伝子のプロモーター）と $P_{fruEKFG}$（糖質 ATP 結合カセット輸送体をコードする遺伝子群のプロモーター）は大腸菌において比較的低い活性を示すことを明らかにした．対照的に *B. longum* では，P_{xfp} はグルコース存在下で，$P_{fruEKFG}$ はフルクトース，キシロースまたはリボース存在下で高い活性を示すことを明らかにし，P_{xfp} と $P_{fruEKFG}$ は Tpase 遺伝子の発現制御に適すると考察している．

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は 51ATG であることが *in silico* 解析から推定されている．しかし，51ATG 以外にも 60ATG，105ATG，159GTG などの翻訳開始点の候補が存在する．本論文では，これらの中から 51ATG を翻訳開始点とする Tpase ($Tpase_{51}$) と 60ATG を翻訳開始点とする Tpase ($Tpase_{60}$) の遺伝子を用いて，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ている．はじめに，$Tpase_{51}$ または $Tpase_{60}$ を $P_{fruEKFG}$ の制御下で発現可能な 2 種類の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．その後，作出した 2 株に，IS*Blo11* の逆位反復配列を含むトランスポゾンベクターpBFS12（転移ベクター）を導入した．その結果，$Tpase_{51}$ および $Tpase_{60}$ の発現により 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 の効率で作出することに成功している．また，pBFS12 は共通性のない 3 または 4 bp の塩基を標的として，ゲノムの様々な部位に挿入されていた．これらの結果は，構築された実験系を用いて，*B. longum* ゲノムへのトランスポゾン変異導入が可能であることを示している．

本論文の結論として，これまで未開発であったビフィズス菌のトランスポゾン変異導入系の開発に成功し，ゲノムへの網羅的な変異導入が可能であることが示されている．*B. longum* ゲノムへのトランスポゾン変異導入系はこれまで開発例がなく，本系の開発により，ビフィズス菌の様々な遺伝子の機能解析が加速することが期待される．したがって本研究は，ビフィズス菌の腸管定着および有益効果の分子機構の解明に大きく貢献する研究として高く評価できる．

よって審査員一同は，阪中幹祥氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた．