



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 [全文の要約]
Author(s)	阪中, 幹祥
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/58924
Type	doctoral thesis
File Information	Mikiyasu_Sakanaka_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

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 *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

(Development of a transposon mutagenesis system

using the insertion sequence element *ISBlo11* 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嫌気性細菌であり、便通改善効果、コレステロール低下作用および抗アレルギー作用といった様々な健康増進効果を宿主に発揮することが知られている。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。この分子機構を深く理解するために、近年、様々なビフィズス菌種／株のゲノムが解き明かされている。現在、ほとんど全てのビフィズス菌種において、ドラフトゲノム配列を含めたゲノム配列がデータベース上で公開されている。

ビフィズス菌の腸管定着および健康増進効果の分子機構を解明するためには、ビフィズス菌ゲノムの解読だけでは不十分であり、ビフィズス菌ゲノム上に存在する一つひとつの遺伝子の機能を解明することが必要であると考えられる。これまでに、遺伝子機能解析に必要とされる遺伝子操作系がビフィズス菌において着実に開発されてきた。1980年代にビフィズス菌のプラスミドが発見されて以降、多数の大腸菌-ビフィズス菌シャトルベクターの構築やビフィズス菌の形質転換法の確立が報告されている。さらに、構築した大腸菌-ビフィズス菌シャトルベクターと形質転換法を用いることにより、異種遺伝子の発現がビフィズス菌において可能になっている。しかし、上記のような成果があるにもかかわらず、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はいまだ十分に開発されていない。標的遺伝子への変異導入系は最近になってようやく数種類のビフィズス菌種／株で確立され始めているが、ゲノムのランダムな部位に変異を導入できるトランスポゾン変異導入系は*Bifidobacterium breve*の2株で確立されているだけで、ほとんど手つかずの

状態といっても過言ではない。そこで本研究では、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*においてトランスポゾン変異導入系を新たに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) 因子がしばしば使用される。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* subsp. *longum* 105-A 由来の IS 因子 *ISBlo11* (1,432 bp) を単離することに成功した。*ISBlo11* は IS3 family に属しており、転移酵素 (transposase: T_{pase}) の認識部位となる逆位反復配列 (inverted repeat: IR) の間に 1 個の T_{pase} 遺伝子が挟まれた構造をしていた。また、ビフィズス菌種/株間での *ISBlo11* のコピーの保存性を nucleotide BLAST 解析により調査したところ、完全長 *ISBlo11* のコピーは特定の *B. longum* 株にしか保存されておらず、それらの株における完全長 *ISBlo11* のコピー数は基本的には低いことが明らかになった。この結果より、*ISBlo11* の保存性は比較的低いことが示されたので、*ISBlo11* は様々なビフィズス菌種/株に応用可能であることが示唆された。続いて、*ISBlo11* 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、*ISBlo11* 由来の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。この結果は、*ISBlo11* がトランスポゾン変異導入に適した機能を有していることを示唆している。

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

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、ISBlo11 の T_{pase} 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、T_{pase} の発現によって T_{pase} 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。この問題を解決するためには、大腸菌では遺伝子発現が抑制されるが、ビフィズス菌では高い遺伝子発現を達成できるプロモーターを選出し、そのプロモーターにより T_{pase} 遺伝子を発現制御させたベクターを構築する必要がある。しかし、これまでのところ、大腸菌で活性が低いビフィズス菌プロモーターはほとんど同定されていないに等しかった。そこで、トランスポゾン変異導入系の確立に向けて、大腸菌での活性が低く、かつ *B. longum* subsp. *longum* で高い活性を示すビフィズス菌プロモーターを同定することを目的とした。

α -ガラクトシダーゼ遺伝子上流に、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* subsp. *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、計7種類のプロモーターの活性を評価した。その結果、P_{xfp_Blo} (*B. longum* subsp. *longum* 105-A 由来の D-キシロース 5-リン酸/D-フルクトース 6-リン酸ホスホケトララーゼ遺伝子プロモーター)、P_{xfp_Bbr} (*B. breve* 203 由来の D-キシロース 5-リン酸/D-フルクトース 6-リン酸ホスホケトララーゼ遺伝子プロモーター) および P_{fruEKFGBlo} (*B. longum* subsp. *longum* 105-A 由来のフルクトース特異的 ABC 輸送体の遺伝子群から成る推定オペロンのプロモーター) の大腸菌における活性は、他の4種類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* subsp. *longum* では、P_{xfp_Blo} と P_{xfp_Bbr} 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、P_{fruEKFGBlo} 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、P_{xfp_Blo}, P_{xfp_Bbr} および P_{fruEKFGBlo} は大腸菌では活性が低く、*B. longum* subsp. *longum* では高い活性を示すため、T_{pase} 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 *ISBlo11* 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

ISBlo11 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、 $P_{fruEKFG_Blo}$ の制御下で *ISBlo11* 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* subsp. *longum* 105-A に導入した。次に、構築された 2 株に、*ISBlo11* 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 *ISBlo11* 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 IS3 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* subsp. *longum* 株をそれぞれ約 10^3 および約 10^2 CFU/ μ g 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* subsp. *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 *ISBlo11* と *ISBlo11* 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、*B. longum* subsp. *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。