

ビフィズス菌由来の挿入配列 TLS143 を用いた

ランダム変異導入系の構築

食品安全・機能性開発学講座 胃腸内圏微生物学分野

阿部光紗

【背景と目的】

ビフィズス菌はヒトの健康促進に寄与する腸内細菌であり、食品や医薬品に利用されている。しかし、ビフィズス菌と宿主との相互作用の機構については未だ不明な点が多い。なぜなら、ビフィズス菌は遺伝子操作技術の開発が進んでおらず、宿主との相互作用に関わる遺伝子が特定されていないためである。特に機能未知遺伝子の機能解析に有効な染色体へのランダム変異導入法はまだ報告されていない。当研究室では *Bifidobacterium longum* 105-A 株から、IS3 Family に属する転移能を持った挿入配列 TLS143 を単離している。そこで本研究は、TLS143 を用いたビフィズス菌染色体上へのランダム変異導入法の確立を目的とした。

【方法】

まず、スクロース感受性を付与する遺伝子 *sacB* に対する TLS143 の転移による不活性化を指標に、TLS143 の転移頻度を測定した。また、各種ビフィズス菌及び TLS143 の単離元株である *B. longum* 105-A 株染色体について、PCR 法と塩基配列決定より TLS143 の挿入部位を調べた。さらに、ランダム変異導入系を確立するため、TLS143 の転移能を利用した変異導入ベクターを構築した。その後、完成させたベクターを *B. longum* 105-A 株に導入し、変異導入株を取得した。得られた変異導入株について染色体上にランダムに変異が導入されたことを PCR およびサザンハイブリダイゼーションで確認した。

【結果・考察】

TLS143 の転移頻度を測定した結果、TLS143 は *sacB* 遺伝子上へ 10^{-6} の確率で転移することが明らかになった。この値は、一般的な挿入配列の転移頻度である 10^{-5} ~ 10^{-7} と同程度である。また TLS143 の挿入部位を調べた結果、TLS143 の標的配列は 3 塩基であり、少なくとも 8 種類の 3 塩基を標的とすることが明らかになった。これにより、TLS143 の染色体への挿入はランダムに起こることが示唆された。構築したランダム変異導入ベクターを用いて得られた変異導入体についてコロニー PCR、ゲノム PCR を行った結果、転移した DNA 断片が染色体上に存在することが明らかになった。また、サザンハイブリダイゼーションを行い、ゲノム上にランダムに変異が導入されているかどうかを確認している。