

# 異種遺伝子発現への応用を目的としたビフィズス菌プロモーターの機能解析

共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 胃腸内圏微生物学 玉井早紀

## 1. 背景・目的

ビフィズス菌はヒトの腸内常在菌であり、ヒトに対する健康増進効果と安全性が広く認知されている。さらに近年では、異種遺伝子発現のビフィズス菌への応用が進められている。しかし、今日までに異種遺伝子発現に使用されているビフィズス菌のプロモーターの種類は限られている。そのため、ビフィズス菌由来の新たなプロモーターについて、その機能を明らかにすることにより、異種遺伝子発現に使用できるようにする必要がある。そこで本研究では、異種遺伝子発現への応用を目的として、ビフィズス菌の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ ( $\alpha$ -Gal) 活性を指標としたレポーターアッセイ系を構築し、ビフィズス菌由来のプロモーターの活性を評価した。

## 2. 方法

まず、ビフィズス菌が保持する推定恒常発現型または推定糖質誘導発現型のプロモーター7種類を選抜した (Table 1)。 $\alpha$ -Gal をコードする *aga* の上流に、それぞれのプロモーターを連結し、レポーター解析用ベクターを作製した。これらのベクターを *Bifidobacterium longum* 105-A の *aga* 欠失株に導入し、プロモーター活性評価用の株を構築した。1/2MRS 培地中の糖源を変化させた条件下で、構築した7株を培養した。菌体破碎後の遠心上清を粗酵素とし、 $\alpha$ -Gal の比活性を測定することで、プロモーターの活性を評価した。

Table 1 Promoters used for evaluating promoter activity

Inserted promoter	Original <i>Bifidobacterium</i> species	Putative expression manner	Putative function of original genes of promoter
$P_{gap\_longum}$	<i>B. longum</i>	Constitutive	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
$P_{xfp\_breve}$	<i>B. breve</i>	Constitutive	Xylulose 5-phosphate /Fructose 6-phosphate phosphoketolase
$P_{xfp\_longum}$	<i>B. longum</i>	Constitutive	Xylulose 5-phosphate /Fructose 6-phosphate phosphoketolase
$P_{scrP\_animalis}$	<i>B. animalis</i>	Carbohydrate-inducible	Sucrose phosphorylase
$P_{scrP\_longum}$	<i>B. longum</i>	Carbohydrate-inducible	Sucrose phosphorylase
$P_{cscBA\_longum}$	<i>B. longum</i>	Carbohydrate-inducible	Sucrose permease, $\beta$ -fructofuranosidase
$P_{fruEKFG\_longum}$	<i>B. longum</i>	Carbohydrate-inducible	Fructose-specific ATP-binding cassette transporter

## 3. 結果と考察

1%グルコース添加区では、推定恒常発現型のプロモーターの活性は高かった。一方、同区での推定糖質誘導発現型のプロモーター活性は低かったが、糖源を変えることで、活性が上昇した。 $P_{scrP\_animalis}$ 、 $P_{scrP\_longum}$  および  $P_{cscBA\_longum}$  では、スクロースまたはラフィノースにより活性が上昇した。 $P_{fruEKFG\_longum}$  は、フルクトース、キシロースまたはリボースによって活性が上昇し、いずれの糖においても1%よりも4%の方が活性が高かった。特に、1%グルコース添加区での結果と比較して、4%キシロース添加区で約100倍のプロモーター活性を示し、7種のプロモーターの中では最も活性が高かった。これらの結果から、 $P_{fruEKFG\_longum}$  は、高発現を示す糖質誘導型プロモーターとして使用できると考えられる。以上の結果から、これらのプロモーターと培地に添加する糖質の条件を組み合わせると、目的に応じた異種遺伝子の発現の調節が可能であると考えられる。