

## 消化管内特異的に発現するビフィズス菌遺伝子の探索系の構築

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 平等 清夏

### 1. 目的

ビフィズス菌はヒトに対して様々な有用効果を示すことで知られている。それらの有用効果は、ビフィズス菌とその宿主であるヒトとの相互作用によってもたらされると考えられている。我々は、ビフィズス菌 - 宿主間の相互作用には、消化管内特異的に発現するビフィズス菌遺伝子が関与していると予想した。そこで本研究では、相同組み換え酵素 Cre の発現の有無を指標として、マウス消化管内特異的に発現するビフィズス菌遺伝子を網羅的に探索することを目的とした。Cre の発現は Cre の標的配列である *loxP* に挟まれた薬剤耐性遺伝子が、Cre の作用でビフィズス菌染色体上から除去されることで検出できる。実際の実験では、プロモーターを欠損した Cre 遺伝子上流に、ランダムに切断した *Bifidobacterium longum* 105-A のゲノム DNA 断片を挿入したベクターを作製する。ベクターを導入した株において、薬剤耐性遺伝子が除去された場合、Cre 遺伝子上流に挿入したゲノム DNA 断片中には活性のあるプロモーターが存在すると判断できる (図 1)。本研究では、探索系を構成する菌株と Cre 発現用ベクターの構築を行った。



図 1 本研究における Cre/*loxP* 系の応用

### 2. 方法と結果

まず、*Bifidobacterium longum* 105-A の染色体上に、*loxP* に挟まれたスペクチノマイシン耐性遺伝子 ( $Sp^R$ ) の断片 (*loxP*- $Sp^R$ -*loxP*) が挿入された宿主株を、二重相同組換え法により取得した。

次に、Cre 発現ベクターの構築を行った。Cre の発現を指標として活性のあるプロモーターを検出するためには、プロモーターを欠損した Cre 遺伝子からの基底レベルの Cre の発現が無いこと、つまり  $Sp^R$  の除去が起こらないことが前提条件となる。プロモーターを欠損した Cre 遺伝子を連結したベクター pBFH65 を構築し、宿主株に導入した。その結果、予想に反して、 $Sp^R$  の除去が観察され、 $Sp^R$  の保持率は 23.4% となった。この結果は Cre/*loxP* 系がビフィズス菌内で機能することを示す一方、基底レベルの Cre の発現が起こっていることを示唆した。そこで、Cre 遺伝子の翻訳効率を低下させるために Cre 遺伝子のリボソーム結合部位の隣接の領域を改変した Cre 発現ベクターと、Cre 遺伝子の転写を抑制するために Cre 遺伝子上流にターミネーターを挿入した Cre 発現ベクターを作製し、宿主株に導入した。その結果、 $Sp^R$  の保持率は改変しない場合と比較して最大で 97.3% まで上昇したため、Cre の基底レベルの発現量を大幅に抑えることに成功したと考えられる。

今後、Cre 遺伝子上流に恒常発現型プロモーターを挿入し、染色体上の  $Sp^R$  が確実に除去されることを検証することにより、消化管内特異的に発現するビフィズス菌遺伝子の探索系を完全に構築できる。