

マウス消化管内で特異的に発現するビフィズス菌遺伝子の探索

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 河口 礼佳

1. 背景・目的

主に大腸に生息するビフィズス菌はヒトと共生関係にあり、ヒトに対して健康増進効果を発揮することが知られている。しかし、宿主-ビフィズス菌の共生メカニズムは、未だ十分に解明されていない。そこで本研究では、宿主-ビフィズス菌の共生メカニズムを分子レベルで理解する端緒として、約2,000個のビフィズス菌遺伝子の中から「消化管内で特異的に発現する遺伝子」を網羅的に特定することを目指している。

2. 方法

目的遺伝子を特定する方法として、多種多様な細菌が生息する消化管内で、ビフィズス菌の遺伝子発現を正確に評価可能な R-IVET (recombinase-based *in vivo* expression technology) 法を選択した (Fig. 1)。

R-IVET 法は「消化管内で特異的に機能するプロモーター領域」を特定することにより、「消化管内で特異的に発現する遺伝子」を同定する手法である。手順を次の①～④に示す。①組換え酵素 Cre の ORF 上流に、ビフィズス菌のランダムなゲノム DNA 断片を挿入したプラスミドライブラリーを作製した。②本ライブラリーを、組換え酵素の認識配列 (*loxP*) で挟まれたスペクチノマイシン耐性遺伝子 (Sp^R) を染色体上に持つビフィズス菌株に導入し、ビフィズス菌ゲノム 99.9%以上を網羅する約 120,000 株の形質転換体を取得した。③②のビフィズス菌ゲノムライブラリーを培地中およびマウス消化管内でのスクリーニングに供し、マウス消化管内でのみ Sp^R が脱落した株、つまり「ゲノム DNA 断片中に、消化管内で特異的に機能するプロモーター領域を持つ株」を選抜した。④ビフィズス菌のゲノム配列を参照し、選抜した菌株が持つゲノム DNA 断片の下流に存在する遺伝子を「消化管内で特異的に発現するビフィズス菌遺伝子」と同定した。

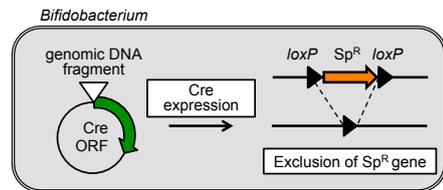


Fig. 1 Cre expression from genomic DNA fragment leads to homologous recombination between two *loxP* sites, which results in an exclusion of Sp^R gene from chromosome.

③②のビフィズス菌ゲノムライブラリーを培地中およびマウス消化管内でのスクリーニングに供し、マウス消化管内でのみ Sp^R が脱落した株、つまり「ゲノム DNA 断片中に、消化管内で特異的に機能するプロモーター領域を持つ株」を選抜した。④ビフィズス菌のゲノム配列を参照し、選抜した菌株が持つゲノム DNA 断片の下流に存在する遺伝子を「消化管内で特異的に発現するビフィズス菌遺伝子」と同定した。

3. 結果・考察

③の結果、計 74 個の候補株を選抜した。そのうち 24 株が持つゲノム DNA 断片は、ビフィズス菌のゲノム配列上で遺伝子の下流に位置しており、プロモーター領域であることが予想された。よって、24 個の領域の下流に存在する遺伝子を推定の「消化管内で特異的に発現するビフィズス菌遺伝子」と同定した。同定した遺伝子の中には、消化管内での生存に重要な可能性のある遺伝子が含まれていた他、機能未知の遺伝子も多数含まれていた。24 個の遺伝子について詳細な解析を行った結果、培地中での発現は極めて弱いことが示唆された。一方、消化管内での発現は比較的弱い、もしくは消化管の限られた部位でのみ発現することが示唆された。

4. 今後の展望

今後は、同定した 24 個の遺伝子が実際に宿主-ビフィズス菌の共生関係の構築に寄与しているかを検証する。