

消化管における生存と定着に寄与する

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 中川路 伸吾

1. 背景と目的

ビフィズス菌は摂取することでヒトに健康増進効果を与えるプロバイオティクスとして広く用いられている。摂取したビフィズス菌がヒトに有用効果を与えるためには、消化管を通過する間生存状態を維持し、定着する必要がある。そのため、これらの生存と定着の分子機構を解明することは非常に重要である。そこで本研究では、ビフィズス菌の消化管における生存と定着に寄与している遺伝子を特定することを目的とした。その方法として、トランスポゾン変異導入系を用いて作製したビフィズス菌の変異株ライブラリーをマウスに投与し、INSeq (Insertion-sequencing) 法¹⁾を用いて投与後のライブラリー中の各変異株の増減を評価することで、目的の遺伝子を探索することを計画した。実際に投与を経て菌数が減少した変異株は、消化管における生存と定着に寄与する遺伝子が変異していると考えられる。本研究では探索系の構築に向けて、様々な生物種で利用されている転移因子 *Himar1C9* を用いたトランスポゾン変異株ライブラリーの作製を検討した。

2. 方法

Bifidobacterium longum 105-A (105-A 株) を宿主株としてトランスポゾン変異株の取得を行った。*Himar1C9* の転移酵素遺伝子を含むビフィズス菌で複製可能なベクターを 105-A 株に導入し、培養することで転移酵素の発現を誘導した。この転移酵素を発現した菌体に、「転移酵素の標的配列である逆位反復配列 (Inverted Repeat, IR) にスペクチノマイシン耐性遺伝子 (Sp^R) が挟まれたトランスポゾン (IR-Sp^R-IR)」を含むビフィズス菌で複製されないベクターを導入し、スペクチノマイシン含有寒天培地で IR-Sp^R-IR が 105-A 株のゲノム上に転移した変異株 (トランスポゾン変異株) を選抜した。得られた 11,114 変異株における IR-Sp^R-IR の転移領域を、次世代シーケンサー MiSeq を用いて網羅的に決定した。

3. 結果と考察

IR-Sp^R-IR を含むベクターを導入した結果、平均 123 変異株/ μg DNA の効率でトランスポゾン変異株の取得に成功した。次世代シーケンサーを用いた IR-Sp^R-IR 挿入部位の網羅的な解析の結果、転移領域は 105-A 株染色体 DNA 上に偏りなく分布しており、11,114 変異株中に 105-A 株の全遺伝子のうち約 67% の遺伝子の変異株が存在することが示唆された。

以上から、本トランスポゾン変異導入系は、105-A 株の遺伝子に網羅的な変異を導入することが可能であると考えられた。今後は、更に変異株を集積したトランスポゾン変異株ライブラリーを作製し、INSeq 法に供することにより、消化管における生存と定着に寄与するビフィズス菌遺伝子を特定する予定である。

参考文献：1) Goodman *et al.*, *Cell Host Microbe*, **6**, 279–289 (2009).