

R-IVET 法を用いたマウス消化管特異的に発現する ビフィズス菌遺伝子の同定

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 石神 夏実

1. 背景と目的

ビフィズス菌は哺乳類の大腸内に生息し、整腸作用や免疫活性化作用など宿主に対して有用な効果を発揮することが知られている。しかし、消化管におけるビフィズス菌の生存や、宿主との相互作用におけるメカニズムは未だ明らかになっていない。そこで当研究室では、ビフィズス菌の腸内生存や宿主との相互作用に関わるメカニズム解明の端緒として、R-IVET法 (recombinase-based *in vivo* expression technology) を用いて、消化管特異的に発現するビフィズス菌の遺伝子を網羅的に同定することを目的とした。

2. 方法

これまでの研究で、部位特異的組換え系である Cre/loxP を用いて、ビフィズス菌における R-IVET 法を確立している。本系では、loxP に挟まれたスペクチノマイシン (Sp) 耐性遺伝子 (Sp^R) を *Bifidobacterium longum* 105-A 株 (105-A 株) の染色体上に挿入した宿主株に、105-A 株のランダムな DNA 断片を Cre ORF 上流に連結したベクターを導入することにより、ゲノムライブラリーが構築されている。この DNA 断片中のプロモーター領域が機能すると、Cre が発現して Sp^R が除去される。これを利用して、まず本ライブラリーを Sp 含有液体培地で培養し、培地中で機能するプロモーター領域を有する株を排除した (1 次選抜)。1 次選抜後のライブラリーを BALB/c 雌マウスへ経口投与すなわちマウス消化管特異的に機能するプロモーター領域を有する株を選抜した (2 次選抜)。プロモーター領域のゲノム上の位置を決定し、その下流の遺伝子をマウス消化管特異的に発現する遺伝子として同定した。通常飼育マウスを用いて第 1 回・第 2 回の R-IVET 解析を行ったが、これらの試験は「105-A 株がマウス消化管に定着しない」という課題がある中で行われたため、105-A 株がマウス消化管に定着可能な状態で R-IVET 解析を実施すべく、川瀬らにより確立された通常飼育マウスへの 105-A 株の長期定着飼育系を利用し、第 3 回・第 4 回の R-IVET 解析を行った。

3. 結果と考察

全 4 回の R-IVET 解析により、マウス消化管特異的に発現すると推測されるビフィズス菌遺伝子が 80 個同定された。第 1・2 回の R-IVET 解析では、消化管での発現誘導が報告されている serpin⁽¹⁾ や xylanase といった糖質資化に関わる遺伝子、第 3・4 回では、糖質資化に関わる遺伝子に加え、消化管での定着に関わることが知られている Tad pili⁽²⁾ 遺伝子が含まれていた。また、全 4 回の解析で同定された遺伝子の中には、重複して同定された遺伝子も存在していた。

以上のことより、消化管におけるビフィズス菌の生存に寄与している可能性がある遺伝子が明らかになった。また、各回で重複して同定された機能未知の遺伝子は、ビフィズス菌の生存に寄与する新たな遺伝子である可能性がある。今後の展望として、これらの遺伝子の消化管と培地上での発現量を比較することで、「消化管で特異的に発現している遺伝子」「消化管で重要な役割を担う遺伝子」であることの証明ができると考える。

(1) Ivanov *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 17246-17252 (2006)

(2) O'Connell Motherway *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 11217-11222 (2011)