

INSeq法を用いた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 中島 森

1. 背景と目的

ビフィズス菌はヒト腸内などに生息する偏性嫌気性細菌であり、宿主に様々な健康増進効果を与えることが知られている。しかし、ビフィズス菌が消化管内の様々なストレスに打ち勝ち、定着に至る分子機構については不明な点が多い。そこで本研究では、これらの分子機構を解明するため、INSeq (insertion-sequencing) 法¹⁾を用いて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同定することを目的とした。INSeq法では、塩基配列TAをターゲットとする転移因子 *Himar1C9* を用いて作製したトランスポゾン変異株ライブラリーをマウスに投与し、次世代シーケンス解析とデータ解析を用いて消化管内での各変異株の相対数の増減を測定する。投与を経て相対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に変異していると考えられる。

2. 方法

これまでに確立した *Himar1C9* を用いたトランスポゾン変異導入系を用いて、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A (105-A株) の変異株ライブラリーを構築した。このライブラリーからDNAを抽出後、トランスポゾンに隣接する105-A株由来の配列を特異的に増幅・精製し、Illumina MiSeqに供した。得られた大量の塩基配列から、シェルスクリプトを用いた文字列処理を行って105-A株由来の配列のみを抽出後、Bowtieを用いてゲノムへのマッピングを行った。得られたマッピングデータを、*Himar1* 転移部位解析用ソフトウェア TRANSIT²⁾を用いて解析し、各変異株の定量を行った。次に、解析した変異株ライブラリーの無菌マウスへの投与試験を行った。投与1週間後に解剖して盲腸内容物を回収し、盲腸内の変異株ライブラリーについても次世代シーケンス解析とデータ解析を行い、各変異株の定量を行った。最後に、投与前後の各遺伝子変異株の相対数をTRANSITを用いて比較し、投与後に有意に相対数が減少した遺伝子を特定した。

3. 結果と考察

合計172回の形質転換試験により、105-A株の48,000株の変異株ライブラリーを構築することに成功した。さらに、TRANSITを用いて各TAにおける変異株の相対数を測定することができた。解析の結果、105-A株の全ORFの約74%に変異が導入されていたことから、ゲノム上の遺伝子に網羅的に変異が導入されたライブラリーが構築できたと判断した。また、TRANSITを用いた比較解析の結果、マウス投与後に有意に減少した遺伝子として442遺伝子が同定された。今後は、無菌マウスへの変異株ライブラリー投与試験を反復して行い、消化管における生存と定着に寄与する遺伝子をさらに絞り込む予定である。

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

2) DeJesus *et al.*, (2015) *PLoS Comput Biol* **11**: e1004401.