

INSeq 法を用いたマウス消化管における 生存・定着に寄与するビフィズス菌遺伝子の網羅的同定

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 久保 勇貴

1. 背景と目的

ビフィズス菌はヒト消化管内などに生育する偏性嫌気性菌であり、ヒトに健康増進効果を与えることが知られている。しかしながら、ビフィズス菌が消化管内で胆汁酸などの環境ストレスに打ち勝ち、消化管内に定着するメカニズムについては、未だ不明な点が多い。そこで、本研究では Insertion-sequencing (INSeq) 法¹⁾をビフィズス菌に応用することで、消化管における生存・定着に寄与する遺伝子を網羅的に同定することを目的とした。INSeq 法では、転移因子を用いてゲノム上の遺伝子に網羅的な変異が導入されたトランスポゾン変異株ライブラリーの構築を行う。次に、(1) 構築した変異株ライブラリーをマウスに投与し、次世代シーケンサー (NGS) とデータ解析を用いて投与前後の各遺伝子変異株の数の増減を測定することで、「消化管における生存と定着に寄与する“候補”遺伝子」を網羅的に同定することが出来る。さらに、(2) *in vitro* でも培養を行い、「*in vitro* での生育に寄与する遺伝子」の同定を行う。最後に、(3) (1) と (2) の遺伝子を比較することで、「消化管における生存と定着に寄与する遺伝子」を同定することが可能である。

2. 方法

これまでに、転移因子 *Himar1*C9 を用いることにより、*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A (105-A 株) において 48,000 株からなる変異株ライブラリーの構築に成功している。本研究では、この変異株ライブラリーを用いてマウスへの投与および培養試験を行った。まず、(1) 5 週齢の無菌 Balb/c 雌性マウス ($n=5$) への変異株ライブラリー投与試験を 3 回行った。投与 1 週間後に解剖を行い、盲腸内容物を回収し、DNA を抽出後、105-A 株由来の配列を含むように NGS 解析用サンプルを調製した。これを NGS に供し、データ解析を行った。最後に、投与前後の各遺伝子変異株の相対数を TRANSIT²⁾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同定した。これらの解析を投与試験回ごとに行い、3 回の試験で重複して同定された遺伝子を「消化管における生存と定着に寄与する“候補”遺伝子」とした。次に、(2) 変異株ライブラリーを 1/2 MRS 培地で定常期まで培養し、(1) と同様の方法で「*in vitro* での生育に寄与する遺伝子」の同定を行った。

3. 結果

(1) 消化管における生存と定着に寄与する“候補”遺伝子 280 個、(2) *in vitro* での生育に寄与する遺伝子 18 個を同定した。(1) の遺伝子から (2) の遺伝子を除外することで、目的とする (3) 消化管における生存と定着に寄与する遺伝子 265 個を同定することが出来た。COG³⁾によるカテゴリー化を行ったところ、[E] アミノ酸の輸送・代謝および [G] 炭水化物の輸送・代謝に分類される遺伝子が多く割合を占めていた。また、コール酸排出トランスポーター (Ctr) をコードする遺伝子が同定された。胆汁酸排出は腸内細菌に見られる胆汁酸耐性機構の一つである。ビフィズス菌においても Ctr が胆汁酸耐性に寄与することが以前から推測されていたが、実際にこのトランスポーターが消化管内での生存に寄与することを実証したのは本研究が初めてである。

¹⁾ Goodman *et al.*, (2009) *Cell Host Microbe* **6**: 279-289. ²⁾ DeJesus *et al.*, (2015) *PLoS Comput Biol* **11**: e1004401. ³⁾ Tatusov *et al.*, (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 33-36.