

学 位 論 文 題 名

ビフィズス菌の遺伝子欠損導入系の開発と
遺伝子機能解析への応用

(Development of a Markerless Gene Deletion System and its Application to
Functional Gene Analysis in *Bifidobacterium longum*)

学位論文内容の要旨

ビフィズス菌はヒトの大腸に生息する腸内細菌であり、ヒトの健康に有用な効果を示すことが明らかになっている。しかしながら、「ビフィズス菌が宿主とどのように相互作用して有用な効果がもたらされるのか」という相互作用の詳細なメカニズムについては、未解明の部分が多い。その原因の一つとして、ビフィズス菌のゲノム上に存在する遺伝子の機能を調べる遺伝子機能解析が進んでいないことが挙げられる。現在、ビフィズス菌のゲノム配列情報から、各遺伝子の機能が推定されているが、その機能を最終的に確認するためには、当該遺伝子に欠損変異を導入して表現型の変化を調べる必要がある。しかしながら、ビフィズス菌においては遺伝子欠損導入系が十分に確立されていない。そこで本研究では、基盤技術として二重相同組換え法によるビフィズス菌の標的遺伝子欠損技術を開発し、遺伝子機能解析へ応用することを目的とした。

1) プラスミドの複製タンパク質と不和合性を利用した二回目相同組換えの効率化の検証

まず二重相同組換え法を用いた標的遺伝子欠損技術を構築するために、一般に効率が低いとされている二回目の相同組換えの効率化を目指した。本研究では、ビフィズス菌のプラスミド複製に必要な複製タンパク質 RepA の遺伝子が欠失した条件複製プラスミド pBS423-*ArepA* (RepA の供給により複製可能) と、pBS423-*ArepA* と不和合性であり、RepA を産生できるプラスミドである pTBR101-CM を使用して、二回目の相同組換えの効率化を試みた。具体的にはまず、高い形質転換効率を示す *Bifidobacterium longum* 105-A を供試菌株、標的遺伝子を β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*gal*) とし、pBS423-*ArepA* に *gal* 領域を組み込んだ相同組換えベクターである pBS423-*ArepAgal* を作製して、*B. longum* 105-A に導入し、一回目の相同組換えを行った。得られた形質転換体の染色体上で pBS423-*ArepAgal* の組み込みを確認した。次にこの株に pTBR101-CM を導入し、細胞内に RepA を供給することで、染色体上の pBS423-*ArepA* の複製を誘起する。この際、この複製が染色体の複製と干渉し、生育阻害を起こすので、これを回避するために pBS423-*ArepA* の染色体からの切り出し、つまり二回目の相同組換えが効率的に起こることが期待された。また切り出された pBS423-*ArepA* は、pTBR101-CM と不和合性であるため、薬剤により容易に排除株の選抜が可能であると予測した。

実際に一回目相同組換え体に pTBR101-CM を導入し、薬剤耐性能の消失を指標として二回目の相同組換え体の選抜を行った結果、pTBR101-CM を導入したすべての株が二回目の相同組換え体であることが明らかになった。また、pTBR101-CM を導入しなかった場合に比べて、二回目の相同組換え体の出現効率が 800 倍向上することが明らかとなった。*gal* 周辺の染色体 DNA 構造を解析した結果、二回目の相同組換えが起こり、相同組換えベクターの切り出しおよび菌体内からの排除が確認された。これらの結果から、二回目の相同

組換えが効率的に起こることが証明され、本実験系は遺伝子欠損導入系として十分に機能することが明らかになった。

2) α -Galactosidase 遺伝子欠損株の構築と性状解析

プレバイオティクスとして知られているラフィノース (Raf)の資化に関与する α -ガラクトシダーゼ (α -Gal) をコードすると推定される遺伝子 aga を選択し、遺伝子欠損の導入を試みた。pBS423-*ArepA*に aga の5'および3'側の領域を連結し、相同組換え用ベクターpBS423-*ArepA* Δ aga を構築して、1)と同様の方法で遺伝子欠損の導入を試みた。

一回目の相同組換えの結果、スペクチノマイシン耐性 (Sp) 耐性の一回目の相同組換え体は 2.2×10^2 cfu/ μ g DNAの効率で得られた。ゲノムPCRを行った結果、得られた一回目の相同組換え体は設計通りに作製されていることが確認された。二回目の相同組換えの結果、pTBR101-CMが導入されたクロラムフェニコール(Cm) 耐性の形質転換体は、 3.9×10^2 cfu/ μ g DNAの効率で得られた。Cm耐性の形質転換体をCm添加培地で継代後、Sp耐性の消失を指標として、pBS423-*ArepA* Δ aga の脱落を確認した結果、Cm耐性の形質転換体288株中270株(94%)が、Sp感受性の二回目の相同組換え体であった。Raf資化性試験の結果、Sp感受性の270株中4株でRafの資化能が消失しており、これらの株を aga 欠損候補株とした。候補株のゲノムPCR解析を行った結果、4株とも aga 欠損株(105-A Δ aga 株)であることが確認された。105-A Δ aga 株の aga 周辺構造を解析した結果、 α -Galの活性部位モチーフを含む約1.4 kbpの領域が設計通り欠損しており、相同組換え用ベクターの配列が残存していないマーカーレス欠損変異が導入されていることが確認された。また細胞内に残存しているpTBR101-CMは、リファンピシン処理により細胞から除去できることが確認された。これらの結果から、構築した実験系を用いて遺伝子欠損が導入できることが示された。

糖の資化性試験の結果、Raf以外にも、メリビオースを単一炭水化物源とした場合には、本欠損株はほとんど生育を示さなかった。一方、プラスミドにより aga を相補した105-A Δ aga /pAga135株は、同条件において105-A株と同程度の生育を示した。また α -Gal活性測定の結果、105-A Δ aga 株では活性が確認されなかったのに対し、105-A Δ aga /pAga135株では野生株105-Aに近い α -Gal活性が検出された。これらの結果から、 aga が*B. longum* 105-Aの α -Gal活性を担う主要な遺伝子であることが示された。

以上のように本研究では、未開発であった二重相同組換え法によるビフィズス菌の遺伝子欠損技術の構築に成功し、この技術を利用した直接的な遺伝子機能解析が可能であることを示した。これまでビフィズス菌においては、一回の相同組換えによりベクターを標的遺伝子に挿入して変異を導入する方法が報告されていたが、変異の不安定性や、周辺遺伝子の遺伝子発現への影響が問題となっている。今回確立された手法では、目的株の効率的な取得が可能であるだけでなく、変異部位に薬剤耐性遺伝子などの外来配列が残らないマーカーレス欠損を導入することが可能である。そのため、周辺の遺伝子発現に影響せず、しかも安定な欠損を導入することが可能であり、さらに多重変異の導入も容易に行えると考えられる。今後、本技術の活用により、ビフィズス菌の様々な遺伝子機能が明らかになり、本菌群の有用効果の解明研究が大きく進展するものと期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	横田	篤
副査	教授	小林	泰男
副査	教授	内藤	哲(生命科学院)
副査	准教授	和田	大
副査	助教	吹谷	智

学位論文題名

ビフィズス菌の遺伝子欠損導入系の開発と 遺伝子機能解析への応用

(Development of a Markerless Gene Deletion System and its Application to
Functional Gene Analysis in *Bifidobacterium longum*)

本論文は、和文 163 ページ、図 24、表 16、4 章からなり、参考論文 2 編が付されている。

ビフィズス菌はヒトの健康に有用な効果を示すことが明らかとなっているが、それに関わる宿主とビフィズス菌の相互作用機構については未解明の部分が多く残されている。分子生物学的手法である遺伝子機能解析によって相互作用機構の解明が可能になると考えられるものの、現状としてビフィズス菌における遺伝子機能解析技術の開発は他の細菌と比較して遅れている。特に、最も直接的な遺伝子機能解析技術である遺伝子欠損導入系はビフィズス菌において十分に確立されていない。本論文は、ビフィズス菌における標的遺伝子欠損導入系の開発を試み、構築された系を用いて遺伝子欠損株を作製し、遺伝子欠損株の性状から遺伝子機能解析を行った結果についてまとめたものである。

1) プラスミドの複製タンパク質と不和合性を利用した二回目相同組換えの効率化の検証

一般に標的遺伝子欠損は二重相同組換え法を用いて行われるが、二回目の相同組換えの効率が低いため、変異株の取得を困難にしている。本論文ではまず、ビフィズス菌の標的遺伝子欠損系を構築するために、二回目の相同組換えの効率化を目指した方策が提案されている。その方策は、ビフィズス菌のプラスミド複製に必要な複製タンパク質 RepA の遺伝子が欠失した条件複製プラスミド pBS423- Δ repA (RepA 供給時に複製可能) と、pBS423- Δ repA と不和合性であり、RepA を産生できるプラスミドである pTBR101-CM を使用して、二回目の相同組換えの効率化を図るというものである。まず、pBS423- Δ repA に相同領域を組み込んだ相同組換えベクターを使用して一回目の相同組換えを行う。次に、一回目相同組換え体に pTBR101-CM を導入し、細胞内に RepA を供給して染色体上の pBS423- Δ repA の複製を誘起させる。この際、この複製が染色体の複製と干渉し、生育阻害を起こすので、これを回避するために pBS423- Δ repA の染色体からの切り出し、つまり二回目の相同組換えが効率的に起こることが予測される。

提案された二回目の相同組換えの効率化は、*Bifidobacterium longum* 105-A を供試菌株、

β -Galactosidase 遺伝子 (*βgal*) を標的遺伝子とした実験により検討されている。実際に一回目相同組換え体に pTBR101-CM を導入し、薬剤耐性能の消失を指標として二回目相同組換え体の選抜を行った結果、pTBR101-CM を導入されたほとんどの株が二回目相同組換え体であることが明らかになった。また、pTBR101-CM を導入しなかった場合と比較して、二回目相同組換え体の出現効率が 800 倍向上することが示されている。これらの結果から、提案された系によって二回目の相同組換えが効率的に起こることが証明され、遺伝子欠損導入系として利用可能であると考察している。

2) α -Galactosidase 遺伝子欠損株の構築と性状解析

1) で提案された系を用いた実際の遺伝子欠損株の構築およびその欠損株の性状解析から標的遺伝子の機能解析を行った結果が次にまとめられている。遺伝子欠損の標的としてプレバリオティクスであるラフィノース (*Raf*) の資化に関与する α -Galactosidase (α -Gal) をコードすると推定される遺伝子 *aga* が選択され、実験が行われている。

その結果、薬剤耐性能の消失を指標として二回目相同組換え体が 270 株取得された。これらの株の中から *aga* 欠損株を探索するために *Raf* 資化性試験を行い、*Raf* の資化能が消失した株を 4 株取得した。これらの株のゲノム PCR 解析を行った結果、4 株とも *aga* 欠損株 (105-A Δ *aga* 株) であることが確認された。105-A Δ *aga* 株の *aga* 周辺構造を解析した結果、相同組換え用ベクターの配列が残存していないマーカーレス欠損変異が導入されていることが確認された。これらの結果は、構築された実験系を用いて遺伝子欠損が導入できることを証明している。

105-A Δ *aga* 株の表現型を解析した結果、*Raf* あるいはメリビオースを単一炭水化物源とした場合の生育能が失われ、 α -Gal 活性も検出されなかった。一方、プラスミドにより *aga* を相補した 105-A Δ *aga*/pAga135 株では、同条件での生育能および α -Gal 活性の回復が検出されている。これらの結果から、*aga* が *B. longum* 105-A の α -Gal 活性を担う主要な遺伝子であると考察している。

本論文の結論として、未開発であった二重相同組換え法によるビフィズス菌の遺伝子欠損技術の構築に成功し、この技術を利用して遺伝子機能を解析できることが示されている。また、構築された手法の特徴として、変異部位にマーカー遺伝子などの外来配列が残らないマーカーレス欠損の導入ができ、安定的な変異の導入と多重変異導入を可能にすることが示されている。よって、開発された標的遺伝子欠損技術は、実用性のある変異導入方法としてビフィズス菌の遺伝子機能解析において基盤的な技術となることが期待でき、ビフィズス菌の基礎および応用研究に大きく貢献する技術として高く評価できる。

よって審査員一同は、平山洋佑氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。