

ビフィズス菌をノックアウト

坂口 広大

腸内細菌叢を形成するビフィズス菌や乳酸菌は、下痢防止・便秘改善といった整腸作用、免疫活性化作用、皮膚アレルギー低減などの効果をもつことが報告されており、ビフィズス菌もプロバイオティクスなどによるヒトの健康維持に大きく関わっている微生物として注目され、盛んに研究が行われている。

近年のバイオテクノロジーの急進的な発展に伴い、数多くの微生物のゲノム配列が解読され、その情報が公開されている。ビフィズス菌では、解読されたゲノム配列を十分に活用しきれないのが現状であり、利用可能な情報が比較的少ない。この原因の一つとしてとして、逆遺伝学的なアプローチを可能にする遺伝子操作技術が未だ確立されていないことがあげられる。逆遺伝学とは、解析手法が従来の遺伝学とは逆の手順を踏んでおり、目的の遺伝子を選択的に破壊することで、その遺伝子の生体内における機能を解析することである。逆遺伝学的な手法としては、相同組換えによる遺伝子破壊（ノックアウト）やRNA干渉によるノックダウンなどが用いられる。ビフィズス菌においては、これら遺伝子操作技術が整備されておらず、効率的な遺伝子破壊の報告例は少ない。ここでは、ビフィズス菌の遺伝子操作技術の進展状況と有用性について紹介したい。

ビフィズス菌の遺伝子操作は、Sgorbatiら¹⁾がビフィズス菌にプラスミドを検出したことに端を発する。そして、ビフィズス菌種から数十種のプラスミドが発見され、遺伝子発現、遺伝子破壊などの目的に応じたさまざまなプラスミドが改変・作製されてきた。そして、このようなプラスミドを用いて遺伝子組換えを行うのであるが、プラスミドの導入効率（形質転換効率）が非常に大きな問題となってくる。

大半のビフィズス菌は、形質転換効率が低く、プラスミドなどの外来遺伝子の導入は困難である。この原因の一つとして、ビフィズス菌のもつ制限-修飾系というシステム（導入された外来遺伝子の分解を行い、バリアーとして働く）が挙げられる。近年、この障壁をブレイクできる画期的な方法が開発された。これは、人工的にプラスミドをメチル化することにより、ビフィズス菌体内での分解を回避するという方法であり、あるビフィズス菌に適用したところ、形質転換効率が 10^5 倍向上したことが報告されている²⁾。

遺伝子組換えは、宿主細胞が持つ組換え能力によって

起こるが、遺伝子組換えが起こる頻度が低い。このため、効率的な遺伝子組換えを行うには、高い形質転換効率が求められる。しかし、これでは、遺伝子組換えが可能なビフィズス菌は、形質転換効率の高いものに制限されてしまう。最近、温度感受性プラスミドを用いることで形質転換効率に関わらず効率的な遺伝子組換え（遺伝子破壊）を行うことができる方法が坂口ら³⁾によって報告された。この方法では、 37°C では複製できるが、 42°C の高温では複製することができない温度感受性プラスミドを用いることで、目的の遺伝子破壊株を効率的に取得できることが示された。また、痕跡（選択マーカー）を残さずに標的となる遺伝子のみを破壊する遺伝子破壊法が平山らによって開発され、その実用性が報告された⁴⁾。

これに加えて、今日では、網羅的な解析手法としてトランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなど、そして、これらを統合的に解析するマルチオミクス解析が研究の常套手段となりつつある。そして、これらの研究で得られる結果・知見から仮説が生まれるが、その真偽の検証には、遺伝子操作による遺伝子破壊などの逆遺伝学的な研究が不可欠である。

マルチオミクス解析手法によりビフィズス菌と腸管免疫の関係について大変興味深い研究結果が報告されたが、この研究においてもビフィズス菌の遺伝子破壊実験が行われた。マルチオミクス解析とフルクトーストランスporter遺伝子の破壊により、糖の代謝で産生される酢酸が病原性大腸菌感染症の予防効果をもつことが明らかになった⁵⁾。

こうした遺伝子操作技術および先端技術の拡充により、ビフィズス菌研究を取り巻く状況は変化し、新たな展開を見せている。今後、ビフィズス菌のみならず、ビフィズス菌とヒトの関係について総合的に解き明かすために、より多くの仮説と検証の繰り返しが必要であると考えられる。

- 1) Sgorbati, B. *et al.*: *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 2121 (1982).
- 2) Yasui, K. *et al.*: *Nucl. Acids Res.*, **37**, e3 (2009).
- 3) Sakaguchi, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**, 499 (2012).
- 4) Hirayama, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78** (14), 4984 (2012).
- 5) Fukuda, S. *et al.*: *Nature*, **469**, 543 (2011).