

2015年度 生物工学奨励賞（斎藤賞） 受賞



ビフィズス菌における実用的な 遺伝子変異導入系の開発

吹谷 智



Development of practical gene-mutagenesis systems in bifidobacteria

Satoru Fukiya (*Laboratory of Microbial Physiology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita 9, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-8589*) *Seibutsu-kogaku* **94**: 110-116, 2016.

はじめに

私たちの腸内には100兆個もの腸内細菌が存在しており、その種数は500~1000種になるとも言われている。近年、腸内細菌の研究分野でも次世代シーケンサーの利用が進み、16S rRNA 遺伝子の部分配列の大規模シーケンシングにより、複雑な腸内細菌叢の構造を詳細かつ迅速に知ることができるようになった。これにより、腸内に共生する腸内細菌が、これまで考えられていた以上に私たちの健康や生理に大きく関与していることが明らかにされ始めている¹⁾。その分子機構を解明するために、腸内細菌に対する宿主側の応答が幅広く解析されている。一方で腸内細菌の遺伝子機能の解明が進んでいないため、腸内での共生や宿主への影響に寄与する腸内細菌側の因子の解明は非常に遅れているのが現状である^{2,3)}。この現状を打破するためには、腸内細菌の多くが嫌気性で形質転換が難しいという壁を乗り越え、腸内細菌への遺伝子変異導入を可能にすることが不可欠である。しかし筆者が知る限り、現在主要な腸内細菌で遺伝子変異導入が可能であるのは、*Bacteroides* 属、*Bifidobacterium* 属、*Clostridium* 属および *Lactobacillus* 属の少数の菌種に限定されている⁴⁻⁸⁾。

このような状況の中で筆者らは、ヒトの健康に有用な腸内細菌であるビフィズス菌の代表菌種 *Bifidobacterium longum* を用いて、代表的な二つの変異導入系である「標的遺伝子への欠失変異導入系」および「トランスポゾン変異導入系」の開発に取り組み、実用的なレベルの技術

を確立した。本稿では、これまでビフィズス菌では困難とされていたこれらの技術の確立に至る経緯について概説し、さらにその応用と、今後の腸内細菌研究における遺伝子変異導入系の意義について考察したい。

二つの遺伝子変異導入系の位置づけ

実際の系の開発について解説する前に、上記の二つの変異導入系が遺伝子機能解析の中でどのような位置づけにあるかを、ビフィズス菌を例にとって概説しておきたい(図1)。本研究では、ビフィズス菌の「腸内での共生」および「健康に有用な効果の発揮」という機能について、そのメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目指している。ビフィズス菌が示すこれらの機能は、複雑ではあるが、ビフィズス菌の表現型の一つとして捉えることができる。また多くのビフィズス菌でゲノム情報が明らかになっていることから、遺伝子機能解析の流れとしては逆遺伝学的なアプローチ、すなわち上記のような複雑な表現型に寄与すると考えられる遺伝子を、ゲノム情

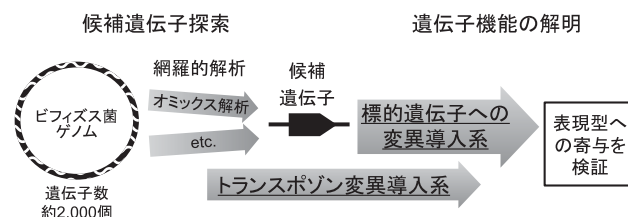


図1. 逆遺伝学的アプローチによるビフィズス菌の遺伝子機能解析

報をベースに同定し、その変異株を作成して実際に表現型への寄与を検証する、という流れになる。

この表現型に寄与する遺伝子を探索する方法としてよく用いられるのは、比較ゲノム解析、トランスクリプトーム解析やメタボローム解析といったオミックス解析に代表される網羅的な解析である。網羅的な解析で同定された遺伝子について、変異株を構築する際に必要なのが、標的遺伝子への変異導入系である。つまり、同定された遺伝子の表現型への寄与を最終的に証明する手段として、標的遺伝子への変異導入系は位置づけられる。

一方トランスポゾン変異導入系は、トランスポゾンのゲノムへの転移により、一度に大量かつ多様な変異株を作製できる系である。そのため、上記のような表現型に寄与する遺伝子を探索するステップに使用可能であり、網羅的解析の一つとして位置づけられる。それに加えて、表現型への寄与の評価を同時に行える点が、トランスポゾン変異導入系の大きな特徴である。このように、上記二つの変異導入系は少し異なる位置づけにある。

標的遺伝子への欠失変異導入系の開発

1) 基盤となるリソースの整備 (菌株, ゲノム配列およびシャトルベクター) ビフィズス菌の形質転換については1990年代から確立が進められているが、概してその形質転換効率は低く、各種シャトルベクターによる形質転換効率の中央値は $\sim 10^3$ colony-forming unit (cfu)/ μg DNA 程度である⁹⁾。そのため、高い形質転換効率を示すビフィズス菌株が今後の技術開発には必須と考えられた。その中で筆者らは、ビフィズス菌の中で例外的とも言える程の高い形質転換効率を示すことが報告されていた*B. longum* 105-A株¹⁰⁾ (以下105-A株)を宿主株として選定した。各種シャトルベクターを用いた場合の105-A株の形質転換効率は最大 10^6 cfu/ μg DNAと非常に高く、上記の中央値の最大1000倍にも達する。本株については、Illumina Genome Analyzer IIxを用いてドラフト配列を、のちにPacBio RSIIを用いて完全長ゲノム配列を決定している¹¹⁾。105-A株のゲノムサイズは2.29 Mbpで、1878 ORFを含んでおり、内在性のプラスミドは存在していなかった。さらに筆者らは、*B. longum* BK25株由来の内在性プラスミドを用いて、大腸菌-ビフィズス菌シャトルベクターpBS423を構築した¹²⁾。このように基盤となるリソースを整え、遺伝子変異導入系の開発を進めた。

2) 標的遺伝子への欠失変異導入系の確立 まず、遺伝子変異導入法のもっとも基本的な方法である、標的遺伝子への変異導入法の確立を行った。この変異導入の方法としては、一回相同組換えによるベクターの挿入や、

二重相同組換えによる標的遺伝子と選択マーカー遺伝子との遺伝子置換などがある。ビフィズス菌の一回相同組換えによる遺伝子への挿入変異の導入については、2009年に*Bifidobacterium breve* UCC2003株において初めて報告されている⁶⁾。この方法は比較的簡便に変異株を構築できるので、筆者らの共同研究でもこの手法が用いられ、*B. longum*のラクト-N-ビオシダーゼをコードする遺伝子の機能解明が行われている¹³⁾。一方でビフィズス菌では利用可能な選択マーカーの種類が限られていることから、筆者らは将来的な多重変異の導入を考慮し、二重相同組換え法により、選択マーカーを残さずに欠失変異を導入する系の構築を目指した¹²⁾。それぞれの変異導入法の特徴と利点、問題点については、筆者らの総説を参照されたい¹⁴⁾。

二重相同組換え法における問題点は、相同組換えの頻度が低い事である。特に選択マーカーを残さないマーカーレスの欠失を導入する場合、2回目の相同組換えが起こった株を、選択マーカーを用いて効率よく選択することはできない。そこで筆者らは、二回目の相同組換えを強制的に起こすことにより、二回目の相同組換え体を高い頻度で得ることを目論んだ。戦略は以下の通りである。まずpBS423から複製に必須なRepタンパク質の遺伝子を除去した条件複製ベクターpBS423- $\Delta repA$ (以下p Δrep : Repの供給により複製可能)と、pBS423と同じ内在性プラスミドを基に、クロラムフェニコール耐性遺伝子を連結したRep供給ベクターpTBR101-CM (以下pRep+)を構築した(図2)。次に、ゲノム上の標的遺伝子の相同部位をp Δrep に連結し、105-A株に導入して得られた一回目の相同組換え体にpRep+を導入すると、Repが細胞内で供給され、染色体上に組み込まれたp Δrep の複製が誘起される。このとき、染色体の本来の複製開始点とは異なる部位からも複製が開始されることになるので、p Δrep からの複製が染色体複製に干渉し、生育阻害が起きる。これを回避するために、染色体からの強制的なp Δrep の切り出し、つまり二回目の相同組換えが高頻度で起こることを想定した(図2)。

実際に105-A株の α -ガラクトシダーゼ (以下 α -Gal) 遺伝子*aga*を標的として、上記の系をテストしたところ、まず一回目の相同組換え体は 2.2×10^2 cfu/ μg plasmid DNAという高い効率で得られた。さらに一回目の相同組換え体にpRep+を導入することにより、二回目の相同組換え体の取得効率をほぼ100%、pRep+を導入しない場合に比べて960倍に向上させることに成功した¹²⁾。染色体から切り出されたp Δrep はpRep+と同種のレプリコンであるため、プラスミドの不和合性が生じる。そのため、クロラムフェニコールでpRep+導入株を選抜

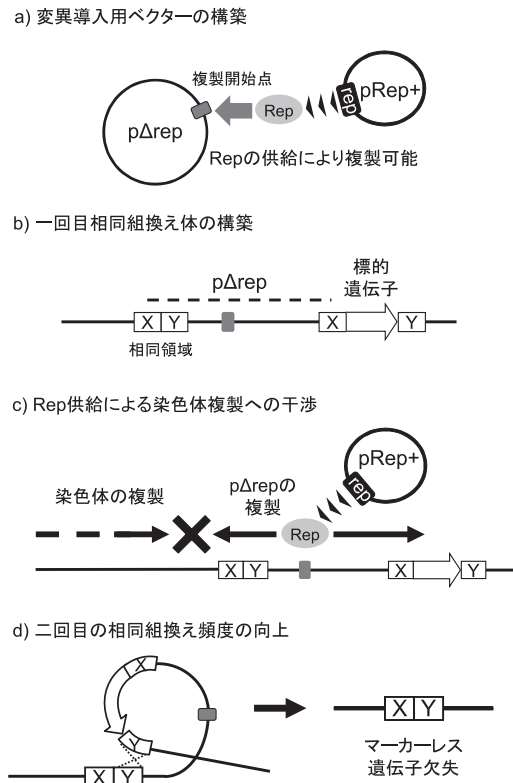


図2. 二回目相同組換えの頻度の向上戦略. a) 変異導入用ベクターの構築. 複製タンパク質Repを産生できない条件複製ベクターpΔrepとRepを産生するベクターpRep+を構築. pΔrepの複製はpRep+に依存する. b) 一回目相同組換え体の構築. pΔrepに標的遺伝子の相同領域(XおよびY)を連結し, 105-A株に導入して一回目の相同組換え体を構築. c) Rep供給による染色体複製への干渉. pRep+を導入し, Repを供給すると, pΔrepの複製が起こり, 染色体複製と干渉する. d) 二回目の相同組換え頻度の向上. 干渉による生育阻害を避けるため, pΔrepの強制的な切り出しが起こり, 二回目の相同組換え頻度が向上する. 図の一部を文献14) [Biosci. Microbiota Food Health, 31, 15–25 (2012)] より許可を得て掲載.

することにより, 細胞からpΔrepが脱落した株が得られる. また, 細胞に残存しているpRep+については, 細胞を低濃度のリファンピシシで処理することにより, 簡単に脱落させることができる. そのため, 本手法は繰り返し用いることができ, 多重変異株の作成も可能であると考えられる.

二重相同組換えの場合, 二回目の相同組換えによって, 目的の欠失株もしくは標的遺伝子座が野生型に戻った株のどちらかが形成される. そのため, PCRと糖の資化性試験により遺伝子型・表現型の評価を行い, *aga*欠失株を同定した. このようにして得られた*aga*欠失株は, α-Gal活性が検出されず, α-Galの基質であるラフィノースやメリビオースを単一炭水化物源として培養した場合, その生育はほとんど観察されなかった(図3). 一方, *aga*をベクターで相補することにより, これらの活性や生育は野生株と同等にまで回復したことから, *aga*が

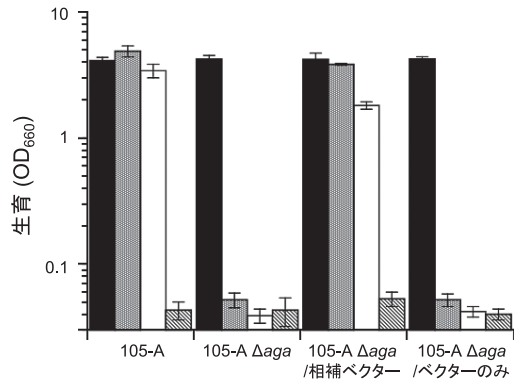


図3. *aga*欠失株およびその派生株の生育. 各種単一炭水化物源を含む半合成培地を用いて, 37°Cで24時間, 嫌気条件下で培養した. 各株のグラフは左から炭水化物源がグルコース, ラフィノース, メリビオースおよび炭水化物源無添加の場合の生育(濁度)を示す: 105-A, *B. longum* 105-A株; 105-A Δaga, *aga*欠失株; 105-A Δaga/相補ベクター, *aga*欠失株にベクターを用いて*aga*を相補した株; 105-A Δaga/ベクターのみ, *aga*欠失株に*aga*を持たないベクターのみを導入した株. 文献12) [Appl. Environ. Microbiol., 78, 4984-4994 (2012), doi: 10.1128/AEM.00588-12] より再掲載: Copyright © American Society for Microbiology.

105-A株のα-Gal活性を担う主たる遺伝子であることが明らかになった¹²⁾.

この遺伝子欠失変異導入系は非常に高い効率で二回目の相同組換え体を取得できるため, 他のビフィズス菌種への応用にあたっては, 一回目の相同組換え体を取得できるかが焦点となる. pΔrepの基になったシャトルベクターであるpBS423を用いた場合の105-A株の形質転換効率は 1.1×10^5 cfu/μg DNAであったことと, 一回目の相同組換え体の取得効率(2.2×10^2 cfu/μg plasmid DNA)から, 少なくとも 10^4 cfu/μg DNAの形質転換効率を示すビフィズス菌種であれば, 本変異導入系を応用することができると思われる.

トランスポゾン変異導入系の開発

1) ビフィズス菌由来の挿入配列の単離と機能解析
標的遺伝子への欠失変異導入系に続いて, 筆者らはゲノムへのランダムな変異導入が可能なたランスポゾン変異導入系の開発を進めた. 第一段階として, トランスポズンを構築するためのリソースとなる転移因子をビフィズス菌からスクリーニングした. 開発を始めた当時は, ビフィズス菌ゲノムの中に細菌の代表的な転移因子である挿入配列 (Insertion Sequence) が複数種存在することが報告されていたものの, 挿入配列そのものについてはほとんど解析されていなかった^{15,16)}. そこで, 転移活性を持つ挿入配列の単離を試みた. まず, *B. longum*のヒト糞由来株13株について, 内在性プラスミドを抽出し, その電気泳動上のプロファイルから, 既知のプラス

ミドよりも塩基対数が増加したプラスミドを同定した。本プラスミドには挿入配列 *ISBlo15* が転移しており、本因子は *IS200/IS605 family* に属することが明らかになった¹⁷⁾。しかしこのファミリーは他の挿入配列と異なり、保存性の高い特定の標的配列に転移することが知られていることから、トランスポゾン変異導入には適さないと考えられた。

そこで、大腸菌にスクロースによる致死性を誘導する枯草菌由来の *sacB* 遺伝子を利用して、転移活性を持つ挿入配列をトラップすることを試みた¹⁸⁾。これは *sacB* を連結したシャトルベクターを 105-A 株に導入し、得られた形質転換体を培養して抽出したベクターの集団を大腸菌に導入し、スクロース耐性を示すクローンを選抜することにより、ビフィズス菌ゲノムから *sacB* へ転移した挿入配列を単離する戦略である。これにより、新規挿入配列 *ISBlo11* を単離した。*ISBlo11* は両末端に 25 bp からなる逆位反復配列 (Inverted Repeat, 以下 IR)、内部に一つの転移酵素遺伝子を持つ典型的な挿入配列の構造を取っており、その配列上の類似性から、*IS3 family* に属する因子であることが明らかになった。このファミリーの転移の標的配列は保存性の低い塩基であることが知られていることから¹⁹⁾、トランスポゾン変異導入系への応用が期待された。転移能の解析を大腸菌 F プラスミドの接合伝達系を用いて行ったところ、*ISBlo11* の F プラスミドへの転移頻度は 5.9×10^{-5} であり、*IS3 family* の他の因子と同等の転移頻度を示した。また、転移領域を解析したところ、転移領域は F プラスミド上のさまざまな部位にわたっており、保存性の低い 3 または 4 塩基を標的配列として転移することが明らかになった¹⁸⁾。このように転移活性を持ち、ランダムな転移が期待された *ISBlo11* を系の構築に用いた。

2) 転移酵素の発現制御に適したプロモーターの選抜とトランスポゾン変異導入系の確立 次のステップとして、*ISBlo11* を用いてトランスポゾンを構築し、それを転移させる系の構築を目指した。先に示した 105-A 株の形質転換効率と *ISBlo11* の転移頻度から、実用的な系の構築には転移頻度の上昇が必要と考えられたため、*ISBlo11* の転移酵素遺伝子をビフィズス菌内で高発現させることを計画した。まず、ビフィズス菌の恒常発現・高活性型プロモーターと知られている *B. longum* 由来のグリセルアルデヒド三リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター P_{gap_Blo} を転移酵素遺伝子の ORF 上流に挿入し、転移酵素遺伝子の高発現を試みた。しかし、大腸菌でのクローニングの際に欠失や塩基置換などの変異が頻発し、目的のベクターが構築できなかった。原因としては、 P_{gap_Blo} が大腸菌でも機能し、転移酵素遺伝子が

腸菌内でも高発現したためと考えられた。そのため、「ビフィズス菌内で高発現が可能だが、大腸菌での活性は低い」という性質を持ったビフィズス菌由来のプロモーターが必要と考えられた。

そこで、プロモーター活性を評価するために、欠失変異導入系の研究で得られた *aga* 欠失株¹²⁾ を利用することにした。*aga* 欠失株は α -Gal 活性を失っているため、*aga* をプロモーター活性のレポーター遺伝子として用いることにより、 α -Gal 活性を指標にプロモーター活性を測定することが可能と考えられた。また大腸菌の α -Gal 欠損株が入手できたため、シャトルベクターに *aga* をレポーター遺伝子として搭載することにより、同じベクターを用いて、ビフィズス菌と大腸菌の両方でプロモーター活性の評価が可能であると考えられた。実際にこのレポーターアッセイ系を構築して、7 種類のビフィズス菌由来のプロモーターの活性を評価した結果、供試した 7 種のうち、前述の P_{gap_Blo} を含む 4 種は、LB 培地で培養した大腸菌内で有意な活性を示したため、系の構築には適していないと考えられた (表 1)。残り 3 種は大腸菌内でほとんど活性を示さず、なおかつビフィズス菌内では P_{gap_Blo} と同等～3 倍以上の活性を示したことから、これらは転移酵素遺伝子の発現に適したプロモーターと考えられた²⁰⁾ (表 1)。この中で、キシロースによる強力な発現誘導が可能な *B. longum* 由来のプロモーター $P_{fruEKFG_Blo}$ を選択し、転移酵素 ORF の上流に連結した転移酵素発現系を構築した。実際にこの転移酵素発現系を含むベクターは問題なく大腸菌内で構築することができた。

続いて、この転移酵素の発現系と、実際に転移する領域であるトランスポゾンをどのようにビフィズス菌に導入するかを考察した。重要な点としては、①転移酵素の高発現と安定供給を可能にする、②転移株を薬剤耐性ではっきりと判別できるようにする、という 2 点を達成する必要があった。詳細はここでは割愛するが、さまざまな戦略をテストした中で、最終的に実用的な効率でトランスポゾン変異導入ができたのは、2 種類のベクターを用いて二段階の形質転換を行う系であった (図 4)。まず ①を達成するために、転移酵素発現系をビフィズス菌内で複製可能な温度感受性複製ベクター²¹⁾に連結し、転移酵素発現ベクターを構築した。さらに ②を達成するために、選択マーカーを含む大腸菌プラスミドの両末端に、*ISBlo11* の両末端の IR を連結し、ビフィズス菌で複製されないトランスポゾンベクターを構築した。また、IR と IR の連結部分には 3 bp の塩基を挿入した。このベクターの構造は、*IS3 family* の挿入配列が転移する際に形成される転移中間体の構造を模したものであり、ベクターそのものがトランスポゾンとして転移酵素に認識さ

表1. *B. longum* 105-A および大腸菌 α -Gal 欠損株におけるビフィズス菌プロモーターの活性^a

プロモーター (鎖長)	推定発現様式	α -Gal 比活性 ($\mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg protein}]^{-1}$)		
		1/2MRS 培地中の炭水化物源	105-A Δaga (1/2MRS 培地)	大腸菌 ΔmelA (LB 培地)
なし	—	1% グルコース	0.01 \pm 0.00	0.13 \pm 0.02
$P_{\text{gap_Blo}}$ (185 bp)	恒常発現型	〃	2.48 \pm 0.48	10.04 \pm 0.15
$P_{\text{scrP_Blo}}$ (329 bp)	炭水化物誘導型	〃	0.31 \pm 0.04	8.52 \pm 0.37
$P_{\text{xfp_Blo}}$ (271 bp)	恒常発現型	〃	1.53 \pm 0.36	0.40 \pm 0.04
$P_{\text{fruEKFGBlo}}$ (283 bp)	炭水化物誘導型	〃	0.08 \pm 0.03	0.78 \pm 0.03
〃	〃	4% キシロース	8.09 \pm 0.81	—
$P_{\text{cscBA_Blo}}$ (182 bp)	炭水化物誘導型	1% グルコース	0.02 \pm 0.01	32.85 \pm 1.75
$P_{\text{scrP_Ban}}$ (268 bp)	炭水化物誘導型	〃	0.05 \pm 0.02	8.41 \pm 0.35
$P_{\text{xfp_Bbr}}$ (264 bp)	恒常発現型	〃	2.10 \pm 0.28	0.17 \pm 0.02

^a 文献20) [*J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 489–495 (2014)] より許可を得て一部を改変して掲載: Copyright © 2014 The Society for Biotechnology, Japan.

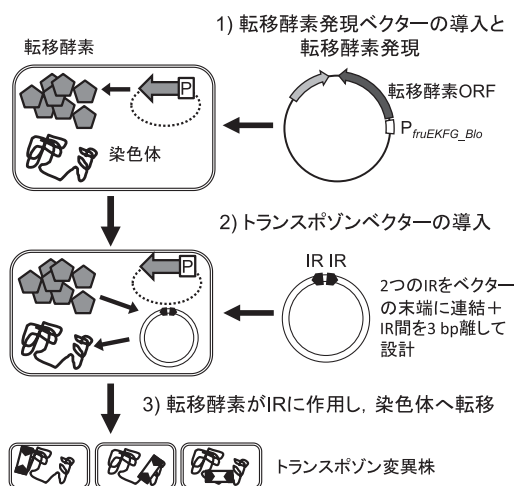


図4. 二段階の形質転換を用いたトランスポゾン変異導入系の概要

れやすい構造となっているため、転移頻度の上昇が期待できた。

実際の操作としては、まず転移酵素発現ベクターを105-A株に導入し、さらにキシロースにより転移酵素の発現を誘導し、転移酵素を十分に供給した。その細胞に対して、ビフィズス菌で複製されないトランスポゾンベクターを導入することで、転移が起こった株のみを薬剤耐性により選抜した。このような二段階の形質転換で転移を誘導した結果、最終的に 10^3 cfu/ μg DNAという非常に高い効率でトランスポゾン変異株を作出することができた。これらの株のゲノムでのトランスポゾンの挿入部位は、ある程度の偏りはあるものの、ゲノム上のさまざまな部位に挿入されていたことから、ビフィズス菌由来の挿入配列を用いた実用的なトランスポゾン変異導入系の構築に初めて成功したといえる(論文投稿中)。

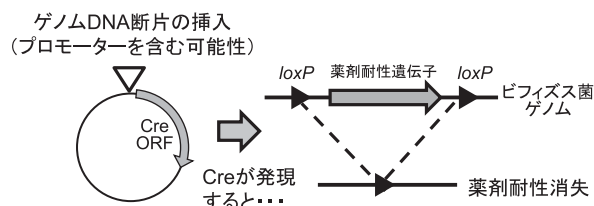


図5. R-IVET法の概要

遺伝子変異導入系の応用

これまで解説してきたように、本研究では代表的な二種類の遺伝子変異導入系を確立することができた。これを用いて、冒頭で解説した目的であるビフィズス菌の腸内共生や健康有効効果に関わる遺伝子について、機能解析を進めることが可能になった。次にこれらの遺伝子変異導入系の応用について、現在進めている研究を紹介したい。

標的遺伝子への欠失導入系を用いる場合は、その前に上記の表現型に寄与すると考えられる遺伝子を何らかの方法で同定する必要がある。そこで筆者らはマウスを用いて、腸内で特異的に発現するビフィズス菌の遺伝子を同定する手法を構築し、現在その評価を行っている²²⁾。この手法はR-IVET法(recombinase-based *in vivo* expression technology)と呼ばれる手法で、ベースとなっているのは標的遺伝子への変異導入系と、Cre/loxPと呼ばれる部位特異的な組換え系である(図5)。まず、Creリコンビナーゼ(以下Creとする)に認識される特異的標的配列であるloxPに挟まれた薬剤耐性遺伝子を、構築した遺伝子変異導入系を用いてゲノム上の生育に影響しない領域に挿入する。Cre ORFの上流に挿入されたゲノムDNA断片の中にプロモーターが存在すると、Creが発現する。発現したCreの作用により、特異的標

的配列である *loxP* に挟まれたゲノム上の薬剤耐性遺伝子が除去される。これを指標として、ゲノムDNA断片の中に、腸内で特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域があるかを判別できる(表2)。あとはビフィズス菌のゲノム配列を参照することにより、腸内で特異的に発現する遺伝子を同定する、という戦略である。R-IVET法では、遺伝子発現を薬剤耐性の消失という表現型で検出できるため、他の腸内細菌が存在している中で、特異的に発現する遺伝子を同定できる点が特徴である。

トランスポゾン変異導入系については、たとえば腸内への定着という表現型に寄与する遺伝子を同定するには、マウスに変異株を投与して、定着能が低下した株を探索する必要がある。しかし、トランスポゾン変異導入系で構築する変異株の集団は数千から数万に上るため、現実的には一株ずつの投与によるスクリーニングは不可能である。対応策としては、トランスポゾン変異株の集団をまとめてマウスに投与し、個々の変異株を識別して、それぞれの動態を評価できればよい、と考えることができる。これは一見夢のような話であるが、新たな技術の開発により、現在これは実行可能になっている。この技術は Transposon insertion sequencing と総称され、次世代シーケンサーの持つ①DNA 1分子ごとに塩基配列を決定できる、②一度に大量のDNA分子の塩基配列を決定できる、という特性を利用して、トランスポゾン変

異株集団の動態を「まとめて」評価することができる²³⁾(図6)。原理としては、変異株集団の変異部位(トランスポゾンの挿入部位)をPCRにより特異的に増幅し、①の特徴を利用することで、各変異株の識別が可能となる。さらに、それぞれの変異部位の検出数は、各変異株の菌数を反映するため、②の特徴を利用することにより、変異株集団中の各株の数を明らかにできる。この手法を用いて、各変異株の増減を投与前と投与後と比較し、投与により減少した変異株を同定することにより、腸内定着に寄与する遺伝子を明らかにすることができる。筆者らもこの手法を利用して、トランスポゾン変異株集団のマウス腸内での生存能の評価を計画している²⁴⁾。

おわりに

本研究により、健康に有用な腸内細菌の代表格であるビフィズス菌において、変異株を用いて遺伝子機能を解明する道が拓かれた。また本研究で開発した二つの系は、どちらも変異導入効率が高いので、他のビフィズス菌種においても幅広く応用できると考えられる。これにより、「ビフィズス菌がどのようにして腸内で共生し、健康に有用な効果を発揮しているのか」というビフィズス菌研究の普遍的な課題の解明が可能になると考えられる。また、分子機構に基づいた新たな健康有用機能の解明と応用につながるも期待される。

腸内細菌研究の今後を俯瞰的に考えると、腸内細菌叢解析の更なる進展により、菌叢変化と宿主の健康や疾病との関連が明らかになり、さらにそれらに寄与する新たな細菌種が同定されてくると予想される^{25,26)}(図7)。それらの菌種が単離されることにより、今後さらに多様な菌種が腸内細菌研究の対象になるだろう。実際に筆者らも生体内の胆汁酸が腸内細菌叢を改変する因子であることを明らかにし、菌叢変化により増加した菌種を単離して解析を進めている²⁷⁾。新たに単離された菌種の機能解明を進めるにはさまざまな課題があるが、本研究でビフィズス菌を題材として示してきたように、それらの菌種において遺伝子変異導入系を確立することが不可欠である。そのため筆者は、本研究で開発した手法を

表2. 腸内特異的に発現する遺伝子の選抜方法

ゲノムDNA断片中の 遺伝子プロモーター	薬剤耐性	
	培地上	マウス投与後
a) プロモーターなし	あり	あり
b) 培地上で発現する	なし	(投与されない)
c) 腸内特異的に発現	あり	なし

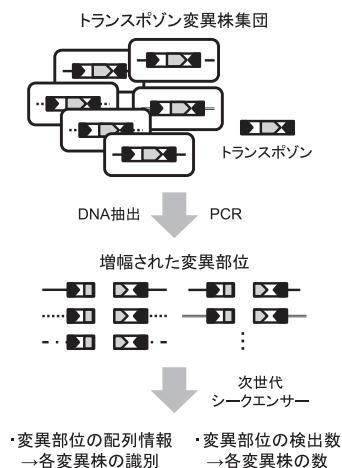


図6. Transposon insertion sequencing法の概要

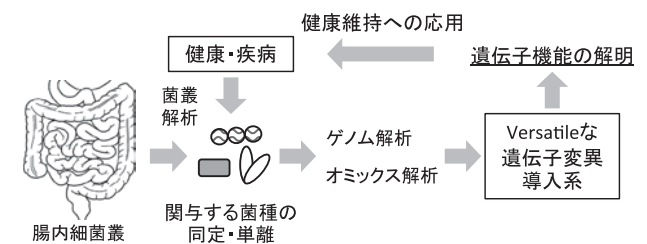


図7. 今後の腸内細菌研究における versatile な遺伝子変異導入系の意義

ビフィズス菌だけでなく、他の腸内細菌種にも拡充し、versatileな遺伝子変異導入法を確立する道を探っていきたいと考えている。このような腸内細菌の生物工学的な解析技術を確立することで、共生や健康・疾病への寄与の分子機構を腸内細菌の側から明らかにし、健康的な生活を送るための応用的なアプローチを可能にしていきたい。

謝 辞

本研究は北海道大学大学院農学研究院 微生物生理学研究室で行われた研究であり、腸内細菌研究について御指導、御鞭撻を賜りました横田篤教授に深く御礼申し上げます。また、本研究を開始するにあたって実験材料を譲渡頂き、ご助言とご指導を賜りました、京都薬科大学元教授の加納康正先生に心より御礼申し上げます。共同研究者であり、本奨励賞にご推薦を頂きました片山高嶺先生（京都大学/石川県立大学）をはじめとして、本研究にご助力、ご助言を頂きました和田大先生、園山慶先生、奥山正幸先生（北海道大学）、鈴木徹先生（岐阜大学）、故・佐々木隆博士（明治乳業）、佐々木泰子先生（明治大学）、小田巻俊孝博士（森永乳業）、ならびに共同でゲノム解析を進めて頂いた兼崎友先生、吉川博文先生（東京農業大学）、志波優先生（いわて東北メディカル・メガバンク機構）に深く感謝申し上げます。また、微生物分子生物学への道を開いてくださった富田房男名誉教授・曾根輝雄先生（北海道大学）に深謝致します。最後に、平山洋佑博士（現アミノアップ化学）、阪中幹祥博士（現石川県立大学）をはじめとする、本研究に携わった学生・大学院生の皆さんの常日頃の努力がなければ、このような賞を頂く事は到底できませんでした。ここに深く感謝致します。

本研究の一部は日本学術振興会、科学技術振興機構およびノーステック財団からの助成を受けて実施されたことを付記致します。

文 献

- 1) Sommer, F. and Bäckhed, F.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 227–238 (2013).
- 2) Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., and other 6 authors: *Nature*, **469**, 543–547 (2011).
- 3) Lee, S. M., Donaldson, G. P., Mikulski, Z., Boyajian, S., Ley, K., and Mazmanian, S. K.: *Nature*, **501**, 426–429 (2013).
- 4) Koropatkin, N. M., Martens, E. C., Gordon, J. I., and Smith, T. J.: *Structure*, **16**, 1105–1115 (2008).
- 5) Ichimura, M., Nakayama-Imaohji, H., Wakimoto, S., Morita, H., Hayashi, T., and Kuwahara, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 3325–3332 (2010).
- 6) O'Connell Motherway, M., O'Driscoll, J., Fitzgerald, G. F., and van Sinderen, D.: *Microb. Biotechnol.*, **2**, 321–332 (2009).
- 7) Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P., and Minton, N. P.: *J. Microbiol. Methods*, **70**, 452–464 (2007).

- 8) Kullen, M. J. and Klaenhammer, T. R.: *Curr. Issues Mol. Biol.*, **2**, 41–50 (2000).
- 9) Fukiya, S., Suzuki, T., Kano, Y., and Yokota, A.: *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research*, pp. 33–51, Caister Academic Press, Norfolk, UK (2011).
- 10) Matsumura, H., Takeuchi, A., and Kano, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1211–1212 (1997).
- 11) Kanasaki, Y., Masutani, H., Sakanaka, M., Shiwa, Y., Fujisawa, T., Nakamura, Y., Yokota, A., Fukiya, S., Suzuki, T., and Yoshikawa, H.: *Genome Announc.*, **2**, e01311–14 (2014).
- 12) Hirayama, Y., Sakanaka, M., Fukuma, H., Murayama, H., Kano, Y., Fukiya, S., and Yokota, A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4984–4994 (2012).
- 13) Sakurama, H., Kiyohara, M., Wada, J., Honda, Y., Yamaguchi, M., Fukiya, S., Yokota, A., Ashida, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K., and Katayama, T.: *J. Biol. Chem.*, **288**, 25194–25206 (2013).
- 14) Fukiya, S., Hirayama, Y., Sakanaka, M., Kano, Y., and Yokota, A.: *Biosci. Microbiota Food Health*, **31**, 15–25 (2012).
- 15) González Vara, A., Rossi, M., Altomare, L., Eikmanns, B., and Matteuzzi, D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **84**, 145–150 (2003).
- 16) Lee, J. H., Karamychev, V. N., Kozyavkin, S. A., Mills, D., Pavlov, A. R., Pavlova, N. V., Polouchine, N. N., Richardson, P. M., Shakhova, V. V., Slesarev, A. I., Weimer, B., and O'Sullivan, D. J.: *BMC Genomics*, **9**, 247 (2008).
- 17) Fukiya, S., Sugiyama, T., Kano, Y., and Yokota, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 141–146 (2010).
- 18) Sakanaka, M., Fukiya, S., Kobayashi, R., Abe, A., Hirayama, Y., Kano, Y., and Yokota, A.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **362**, fmv032 (2015).
- 19) Mahillon, J. and Chandler, M.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 725–774 (1998).
- 20) Sakanaka, M., Tamai, S., Hirayama, Y., Onodera, A., Koguchi, H., Kano, Y., Yokota, A., and Fukiya, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 489–495 (2014).
- 21) Sakaguchi, K., He, J., Tani, S., Kano, Y., and Suzuki, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**, 499–509 (2012).
- 22) 河口礼佳, 平等清夏, 阪中幹祥, 横田 篤, 吹谷 智: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 112 (2014).
- 23) van Opijnen, T. and Camilli, A.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 435–442 (2013).
- 24) 中川路伸吾, 阪中幹祥, 横田 篤, 吹谷 智: 日本乳酸菌学会大会講演要旨集, p. 17 (2015).
- 25) Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., and other 3 authors: *Cell*, **159**, 789–799 (2014).
- 26) Buffie, C. G., Bucci, V., Stein, R. R., McKenney, P. T., Ling, L., Gobourne, A., No, D., Liu, H., Kinnebrew, M., Viale, A., and other 9 authors: *Nature*, **517**, 205–208 (2015).
- 27) Islam, K. B. M. S., Fukiya, S., Hagi, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., and Yokota, A.: *Gastroenterology*, **141**, 1773–1781 (2011).