



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

*Bifidobacterium longum*

NCC2705株の二成分制御系を介した転写調節機構の  
解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小酒井, 智也 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/81607">http://hdl.handle.net/20.500.12099/81607</a>

## 要 約

氏 名 Name	小酒井 智也
題 目 Title of Dissertation	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705 株の二成分制御系を介した 転写調節機構の解明

ビフィズス菌は、ヒト腸内の主要構成菌群の一種であり、ヒトに対して様々な有益な健康効果をもたらすことが知られている。それにも関わらず、ビフィズス菌のヒト腸内への定着に関わる遺伝子発現制御機構は不明なままである。そこで着目したのが、二成分制御系（TCS）である。TCSは、すべての細菌が有する菌体外環境に対する応答系である。サルモネラ菌や結核菌などの様々な病原菌においては、TCSが宿主内での生存や病原性の維持に深く関わっていることがわかっている。そのため、ビフィズス菌においても、TCSがヒトとの共生に何らかの役割をもつと考えられる。TCSの腸内での役割を検証するためには、動物モデルを用いた *in vivo* 系での評価が不可欠である。しかしながら、ビフィズス菌の TCS の分子基盤はほとんど明らかになっていないため、動物モデルによる評価系の構築が困難となっている。そこで、本研究では、ビフィズス菌の代表菌種である *Bifidobacterium longum* NCC2705 株のもつ TCS の分子基盤の解明を目指した。また、TCS の分子基盤の解明に不可欠なビフィズス菌で適用可能なレポーターアッセイ系の開発およびビフィズス菌における基本的な転写機構の解明も目指した。

ビフィズス菌の遺伝子発現系の解明に必要なレポーターアッセイ系の構築では、*Staphylococcus aureus* 由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（CAT）をレポーター遺伝子として用いた。この遺伝子を用いたレポーターアッセイ用プラスミド pBCMAT を構築し、ビフィズス菌内での発現を確認した。その結果、構築した系が様々なプロモーターやターミネーターの転写への影響を評価するのに有効であることがわかった。

次に、ビフィズス菌の基本プロモーターの構造の解明を目指した。プロモーター構造の基本要素である-10領域と-35領域を正確に理解するために、RNA-Seq解析に基づいた転写開始点の網羅的な推定を行った。推定した130の転写開始点の上流配列を用い、-35領域および-10領域のコンセンサス配列を推定した結果、それぞれ5'-TTGTGC-3'および5'-TACAAT-3'が推定された。この推定された配列結果に基づくCATアッセイを行ったところ、-35領域および-10領域中の転写に強い影響を及ぼす配列は、それぞれ5'-TTGNNN-3'および5'-TANNNT-3'であることがわかった。次に、これら2つの領域の間のスペーサー長を解析したところ、一般的な17bpだけでなく、11bpも多く検出された。この傾向は、ビフィズス菌の属する *Bifidobacteriaceae* 科の細菌全般のみにみられた。このスペーサー長の違いは、これまでに報告されていない新たなプロモーター構造であると考えられ

る。また、プロモーターへの結合および転写の開始反応を担うシグマ ( $\sigma$ ) 因子の構造でも、ビフィズス菌の属する Actinobacteria 門の細菌には、 $\sigma$  因子の N 末端に特徴的な極性ドメインが存在していた。

最後に、ここまでの結果に基づき、TCS の分子基盤の解明を行った。まず、*B. longum* NCC2705 株のもつ 10 種類の TCS 中のレスポンスレギュレーター (RR) のうち、7 種類の RR 遺伝子破壊株を作製し、RNA-Seq 解析による発現変動を確認した。その結果、*BL0005* 遺伝子破壊株 ( $\Delta BL0005$  株) で最も多くの遺伝子 (111 遺伝子) の発現が変動していた。また、*BL0005* とそれに対応したヒスチジニキナーゼ (HK) の *BL0006* による *BL0005/BL0006* 制御系は、ほぼすべてのビフィズス菌で保存されている系であるため、この制御系の分子基盤の解明を目指した。RR である *BL0005* が直接制御している遺伝子を特定するために、ChAP-Seq 解析による *BL0005* の結合領域の網羅的な決定を行った。その結果、*BL0005* が 10 以上の遺伝子の上流配列中に存在する 5'-YYCAGN<sub>6</sub>YYCAG-3' の繰り返しモチーフに結合することが明らかになった。また、このモチーフと *BL0005* の相互作用は、BLItz を用いた Bio-layer interferometry 解析、ゲルシフトアッセイおよびレポーターアッセイにおいて確認できた。次に、この繰り返しモチーフの他のビフィズス菌における保存性を確認したところ、多くのビフィズス菌種間で保存されており、この制御系がビフィズス菌共通の制御系であることが示唆された。次に、*BL0005* によって直接制御される転写因子 *BL1414* (*clgR*) および TCS の *BL1645/BL1646* 制御系を対象にして ChAP-Seq 解析を行い、制御系の全体像の把握を行った。その結果、*ClgR* では RNA-Seq によって発現が変動した遺伝子のうち、*ClgR* 結合配列 5'-T<sub>3</sub>CGCYN<sub>3</sub>RGCGA<sub>3</sub>-3' を介して 31 遺伝子の制御に直接関与することが示唆されたが、*ClgR* 結合配列は、ビフィズス菌種間での保存性が低かった。一方、*BL1645/BL1646* 制御系は、*BL1645* 遺伝子破壊株の RNA-Seq 解析の結果と合わせて検証した。その結果、3 つのオペロンの制御を、*BL1645* 結合配列 5'-GGGTGTTCCC-3' が介して行うことが示唆された。*BL0005*、*ClgR*、*BL1645* による階層的な転写制御は、RNA-Seq によって発現が変動していた遺伝子の約 40% の遺伝子の発現制御を担っていることがわかった。HK である *BL0006* の環境応答については、レポーターアッセイの結果から、高浸透圧および胆汁酸に対して発現誘導がみられた。また、 $\Delta BL0005$  株を用いた環境応答性試験では、胆汁存在下で生育が有意に阻害されたことから、*BL0005/BL0006* 制御系が腸内で機能する可能性が示唆された。

*BL0030/BL0031* 制御系は、ChAP-Seq や RNA-Seq、CAT アッセイから、フルクトースやキシロースに応答し、糖トランスポーター *fruEKFG* および糖分解酵素の遺伝子の転写調節を担うことがわかった。また、*BL0030* 遺伝子破壊株ではキシロースの資化性が低下した。したがって、*BL0030/BL0031* 制御系が、キシロースの資化に重要な役割を果たすことが示唆された。