



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>

氏名(本国籍)	小酒井 智也	(岐阜県)
学位の種類	博士(農学)	
学位記番号	農博甲第761号	
学位授与年月日	令和3年3月15日	
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻	
研究指導を受けた大学	岐阜大学	
学位論文題目	<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	
審査委員会	主査 岐阜大学 教授	中川 智行
	副査 岐阜大学 教授	鈴木 徹
	副査 静岡大学 教授	小川 直人
	副査 岐阜大学 准教授	中村 浩平

## 論文の内容の要旨

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 17 bp だけでなく、11 bp 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ンキナーゼ (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' -YYCAGN6YYCAG-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' -T3CGCYN3RGCGA3-3' 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 *fruE*KFG 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。

## 審査結果の要旨

申請者、小酒井 智也は、これまで知見が乏しかったビフィズス菌のプロモーターとその調節機構について基礎的な知見を示す研究を行った。

これまで、ビフィズス菌において、プロモータの発現量を正確に評価するためのレポーター遺伝子に適したものがなかったが、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)を用い、SH基と反応するエルマン試薬の発色で極めて高い直線性を有する評価系を確立した。

次に、これを用いビフィズス菌のコア・プロモータ構造を解析した。RNA-Seq や 40 種を超す変異プラスミドを作成し、ビフィズス菌に戻し解析した結果、-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、5'-TTGNNN-3'および 5'-TANNNNT-3'であることを明らかにした。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 17 bp だけでなく、11 bp も多く検出され、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。これは、今まで全く報告がない新たな知見であり、バクテリアのプロモータ研究における、新しい方向性を示すものとなった。

さらに、バクテリアが物理化学的刺激に応答するための調節メカニズム、二成分制御系について、*Bifidobacterium longum* NCC2705 株において詳細な解明を行った。BL0005, BL0006 遺伝子は、その構造から二成分制御系の構成要素である、レスポンスレギュレーターとセンサーキナーゼであることが予想された。そこで、BL0005 遺伝子の破壊株を作成し、RNA-Seq、ChAP-Seq 解析、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を駆使して解析を行い、コンセンサス配列の決定、支配下にある遺伝子群の同定を行い、さらにはこれらが浸透圧と胆汁酸で制御されていることを示した。

これらの成果は、ビフィズス菌の遺伝子発言の調節を単に次世代シーケンサやインフォマティクスだけでなく、遺伝学的、生化学的な解析を総合し解明したものとして高く評価される。

### 基礎となる学術論文

- 1) Tomoya Kozakai; Ayako Izumi; Ayako Horigome; Toshitaka Odamaki; Jin-zhong Xiao; Izumi Nomura; Tohru Suzuki, Structure of a Core Promoter in *Bifidobacterium longum* NCC2705., *Journal of Bacteriology*, 202(7), e00540-19, (2020).
- 2) Tomoya Kozakai, Yoko Shimofusa; Izumi Nomura; Tohru Suzuki, Construction of a Reporter System for Bifidobacteria Using Chloramphenicol Acetyltransferase and Its Application for Evaluation of Promoters and Terminators. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 印刷中, (2021).

### 既発表学術論文

- 1) Hend Altaib; Yuka Ozaki; Tomoya Kozakai; Yassien Badr; Izumi Nomura; Tohru Suzuki, A new *Escherichia coli* entry vector series (pIIS18) for seamless gene cloning using type IIS restriction enzymes, *Microbiology Resource Announcements*, 8(41), e00323-19, (2019).