

学位論文の内容の要旨

氏 名

木納 康博

論文題目

Counterselection system employing mutated *pheS* for markerless genetic deletion in *Bacteroides* species

(論文要旨)

【目的】

我々の体表面および口腔から直腸に至るまでの消化管には、100種100兆個もの細菌が生息し、各部位で常在細菌叢を形成している。その中で、*Bacteroides* 属は腸内常在細菌叢を構成する優勢菌群の一つである。近年のメタゲノム解析や単一の細菌を定着させたノトバイオトマウスを用いた解析から、*Bacteroides* が宿主の腸管上皮細胞機能や腸管免疫、さらには宿主の代謝系にも大きな影響を与えていることが明らかになりつつある。特に *Bacteroides thetaiotaomicron* (以下 BT) は、下部消化管における優勢菌種のひとつであり、本菌が PPAR- γ を介して NF- κ B の核外移行を誘導し、抗炎症作用を示すことや、抗菌ペプチドおよび IgA 産生の誘導、腸管出血性大腸菌の毒素産生を阻害することから、宿主と常在細菌叢との共生に重要な役割を担うと考えられている。このような背景から、BT は宿主と腸内フローラの腸管共生メカニズム解析の基準株としてよく用いられている。我々は、BT の産生する有益分子を同定するため、*Bacteroides* における in-frame 遺伝子欠失株作製法を開発した。しかしながら、本法は薬剤耐性マーカーを用いたネガティブセレクションを採用しているため、目的遺伝子を欠失したクローンを検索するためには多大な労力と時間を要する。そこで今回、目的遺伝子を欠失したクローンをポジティブセレクションで検索する新たな BT の遺伝子破壊法の開発を試みた。ポジティブセレクションに用いるカウンターセレクションマーカーとして *pheS* 遺伝子に着目した。*pheS* は phenylalanyl-tRNA synthetase の α subunit をコードする必須遺伝子であり、菌種間での相溶性が高い。大腸菌 PheS の 294 番目のアラニングリシンに置換した変異型 PheS は基質特異性が低く、フェニルアラニンのハロゲン化アナログである *p*-chloro-phenylalanine (*p*-Cl-phe) を取り込む。結果的に *p*-Cl-phe の細胞毒性によって菌は死滅する。本研究では、変異型 *pheS* 遺伝子による *p*-Cl-phe 感受性を利用したカウンターセレクション法を開発し、効率よく遺伝子破壊株を作製するシステムの構築を試みた。

【方法および結果】

本研究で用いた変異型 PheS* は、大腸菌 PheS の 294 番目のアラニンに対応する *B. fragilis* (BF) PheS の 303 番目のアラニングリシンに置換させることにより作製した。変異型 *pheS** 遺伝子は、インバース PCR 用のプライマー内に点変異 (GCT→GGA) を導入することにより PCR 合成した。まず、変異型 PheS* が *Bacteroides* において *p*-Cl-phe 感受性を付与するのかを検討した。変異型 *pheS** 遺伝子を大腸菌-*Bacteroides* シェットルベクターである pLYL05 にクローニングし、BF YCH46 株に導入した。pLYL05 あるいは構築した pLYL05-*pheS** を保有する BF YCH46 株を GAM 液体培地で一晩培養した後、培養液の 10 倍段階希釈液を 0-25 mM の *p*-Cl-phe を添加した GAM 寒天培地あるいは最小栄養寒天培地培地 (DMM) に 5 μ l スポットした。その結果、GAM 培地では両株間で顕著な増殖能の違いは認められなかったが、DMM 培地では *pheS** 保有株は対照株と比べ、5 mM *p*-Cl-phe の添加により顕著に増殖が阻害された。BT においても BF と同様な傾向が認められ、DMM 培地では pNLY1-*pheS** ベクター保有株は pNLY1 対照株と比べ、5 mM 以上の *p*-Cl-phe 添加により増殖が阻害された。以上の結果より、変異型 *pheS** 遺伝子は DMM 培地上においてカウンターセレクション遺伝子として良好に機能すると考えられた。

PCR 産物を Cm 耐性カセットとともに自殺ベクター-pKK100-Ex にクローニングし、pKK100-ExpheS* を得た。本プラスミドの遺伝子破壊における有用性の評価のため、BF の PS2 莢膜合成領域および BT の PS1 莢膜合成領域の欠失を試みた。BF の PS2 遺伝子領域あるいは BT の PS1 遺伝子領域の上流および下流領

域 (各 2-kb) をクローニングした自殺ベクター-pKK100-ExpheS*-BFPS2 および pKK100-ExpheS*-BTPS1 を構築し、エレクトロポレーション法によって両菌株の染色体に挿入した。得られた自殺ベクター挿入変異体である BF::pKK100-ExpheS*-BFPS2 および BT::pKK100-ExpheS*-BTPS1 を、それぞれ 15 mM あるいは 10 mM p-Cl-phe 添加 DMM 培地を用いてカウンターセクションを行った。その結果、BF::pKK100-ExpheS*-BFPS2 の場合は 8.91×10^{-3} 、BT::pKK100-ExpheS*-BTPS1 の場合は 1.70×10^{-3} という高頻度で p-Cl-phe 耐性コロニーが得られた。偽陽性率 (Em 耐性株の割合) は 0% であり、全てのクローンにおいて相同組換えによってベクター配列が除去されていた。

【考察および展望】

近年、変異型 *pheS** 遺伝子を利用したカウンターセクション法が多くの菌種において遺伝子破壊に利用されているが、腸管常在嫌気性菌への適用は今回の報告が初めてである。本研究での特筆すべき点は、カウンターセクションにおける偽陽性率の低さである。二回の相同組換え後の p-Cl-phe 添加 DMM 寒天培地上で回収されたクローンは全て薬剤感受性が復帰しており、偽陽性率は 0% であった。カウンターセクションマーカーとして *sacB* 遺伝子を用いた系では偽陽性率の高さがしばしば問題となり、カウンターセクションの条件検討 (培地成分、培養温度等) が必須となる。本研究で開発した *PheS** によるカウンターセクション法は *Bacteroides* の迅速かつ効率的な遺伝子破壊に有用である。これまで用いられてきたレプリカ法では、欠失株を得るまでに膨大な枚数の寒天培地と労力が必要であったが、*PheS** カウンターセクションでは、数枚の p-Cl-phe 添加 DMM 寒天培地を用いるだけで目的クローンの検索が可能である。

ヒトと *Bacteroides* との共生に関する研究の進歩とともに、今後、本菌群のヒトに対する有益な表現型が数多く同定されることが予測される。したがって、様々な *Bacteroides* に適用できる簡便で効率的な遺伝子破壊株作製法の確立が望まれている。今回我々が開発したカウンターセクション法は、様々な *Bacteroides* において探索的な遺伝子解析をするための基盤技術として期待できる。

掲 載 誌 名	Anaerobe	第42号	
(公表予定) 掲 載 年 月	2016 年 9 月	出版社 (等) 名	ELSEVIER
Peer Review	(有) 無		

(備考) 論文要旨は、日本語で1, 500字以内にまとめてください。