

テラーモードプロバイオティクスを目指したビフィズス菌属の俯瞰的ゲノム解析

●鈴木 徹¹⁾ ◆渡邊 邦友²⁾ ◆田中 香お里²⁾

1) 岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・ゲノム研究分野、2) 同・嫌気性菌研究分野

<研究の目的と進め方>

プロバイオティクスは、乳酸菌などの微生物を積極的に摂ることにより、健康を向上させる新しい概念である。しかし、ある菌株が万人にとって有用なのではなく、腸管のレクチンや糖鎖の型によって細菌の腸管での定着性が異なることが知られ、個人の遺伝形質、健康状態、腸内フローラの状況に応じ、菌種を処方する“テラーモードプロバイオティクス”(以下TMPB)という概念が生まれつつある。ビフィズス菌属は、ヒトの健康にとって最も重要な腸内細菌であり、多くのバリエーションがある。腸内の菌叢に大きな個人差があることからTMPBの研究の重要なターゲットの一つである。しかし、生物学的情報が乏しく全体像は理解されていない。本研究では、ビフィズス菌のサブグループのゲノム情報とヒト腸内の最優勢菌種である *Bifidobacterium adolescentis* 菌株間の SNPs 情報を取得し俯瞰することにより、来るべき TMPB の時代のために必要な基礎的な情報を提供することを目的とする。

<2007年度の研究の当初計画>

1) ゲノム情報の取得 ビフィズス菌に関しては、*B. bifidum* JCM1255, *B. breve* JCM1192, *B. catenulatum* JCM1194 について、全ゲノム配列情報を獲得する。また、これ以外にビフィズス菌と進化的に近縁でありながら、口腔や膣などの感染症の原因菌とされていえる *Gardnerella vaginalis*, *Scardovia inopinata*, *Parascardovia denticolens* についてもゲノム解析を検討する。

2) 遺伝子単位での挿入欠失の解析 CDS 単位の解析では、特に①食物繊維となる難分解性の多糖を分解するための酵素遺伝子群、②宿主特異性を決定していると考えられる菌体表層を構成すると考えられるレクチンなどのタンパク質遺伝子群、③ *B. adolescentis* で見いだされた細菌とアーキアに特異的に見いだされる CRISPR 型リピート構造、④制限修飾酵素系遺伝子、などに特に注目して解析をおこなう。

3) ゲノムの水平伝搬と再編成に関する解析 *B. adolescentis* において、ゲノムの約5%がGC含量が50%程度の低GC領域があることが見いだされた。これは、進化上ゲノムの水平伝搬と再編成がおきたこと有力な証拠であると考えられる。自己組織化マップ解析を用い、これらの遺伝子群の進化的由来を明らかにする。他の菌種についても、同様な解析をおこなう予定である。

4) ゲノム情報に基づいた培養法、遺伝子操作系の開発 難培養性のバクテリアの場合、せっかくゲノム配列の情報が得られても、①培養が困難であること、②効率の良い遺伝子導入系が無いことのため、生化学的解析ができない場合がほとんどである。①栄養要求性、②酸素耐性メカニズム、③制限酵素系などの外来遺伝子に対する防御機構についてゲノム情報を解析し、これらの問題を解決する方法を検討している。これらについてあらゆる細

菌に適応可能な一般的方法論として確立したい。

<2007年度の成果>

1) ゲノム情報の取得 本研究において、*Bifidobacterium* 属7菌株と近縁の *Gardnerella*, *Scardovia*, *Parascardovia* の10菌株についてゲノム配列の解析を行った。5株に関して全配列の解析が完了し、1株は公開済みである。

Bifidobacterium adolescentis ATCC15703-- 完成 (公開)

- ・ *Bifidobacterium bifidum* JCM1255-- 完成
- ・ *Bifidobacterium breve* JCM1192-- 完成
- ・ *Bifidobacterium catenulatum* JCM1194-- 完成
- ・ *Gardnerella vaginalis*-- 完成
- ・ *Parascardovia denticolens* -- ドラフト段階
- ・ *Scardovia inopinata* -- ドラフト段階
- ・ *Bifidobacterium dentium*-- ドラフト段階
- ・ *Bifidobacterium scardovii*-- ドラフト段階
- ・ *Bifidobacterium longum infantis* -- ドラフト段階

2) 遺伝子単位での挿入欠失の解析 *B. adolescentis* ゲノム全領域(2.09Mb)を31base長、9 base間隔でカバーする Nimblegen社のカスタムモードタイリングDNAアレイを作成し、ATCC15703をリファレンスとして理化学研究保存株、JCM1251, JCM7042, JCM7044, JCM7045, JCM7046について塩基レベルでの変異、CDS単位での欠失を見た。その結果、*B. adolescentis*の株間での進化、可変領域の存在が見いだされた。また、この方法を、ヒトからの分離株に適応し、個体ごとの常在株を解析するツールとして使用できることを確認した。

3) ゲノムの水平伝搬と再編成に関する解析 上記1)で得られた配列情報、2)で得られた菌株間のIn/Del情報に基づき、自己組織化マップを作成し、ビフィズス菌の成り立ち、他の生物からの遺伝子水平伝搬によって獲得されたかが推定可能である。このことから *Bifidobacterium* 属の成立、*B. adolescentis*の種の成立と進化について詳細な履歴を作成している。

4) ゲノム情報に基づいた培養法、遺伝子操作系の開発 *B. adolescentis*は特に、形質転換効率が低い菌株である。その形質転換効率は10⁹/μgDNA程度であり、せっかく全ゲノム情報が得られていても、逆遺伝学的手法が用いることができず、遺伝学的、生化学的解析ができなかった。我々は、これが特に制限酵素系による外来DNAの分解によっていると考え、これを回避する方法論を開発した。ゲノム情報から制限修飾系の遺伝子群を2グループ選り出し、DNAメチル化酵素を大腸菌にクローン化した。この大腸菌を経ることにより、プラスミドDNAの形質転換効率は、1,000倍程度まで向上した。この方法を Plasmid Artificial Modification (PAM法)と名付けた。

5) その他 Twiki-genome と BifidoBase の構築 公表されたゲノムの

アノテーション情報は、通常、ホモロジー解析をベースとしている。現状では、アノテーションの孫引きが多くなり、信頼性に欠けたものになりがちである。生化学的知見に基づくものなのか、単なるホモロジー解析による推定なのか等の評価付けが不明確になっていることが多い。

また、公表されたゲノムのアノテーション情報は、本来ならば新たな知見を付加しつつ、定期的に更新されるべきである。しかし、データの管理者を置き常に世界の情報を収集しつつデータを更新することは容易ではない。

これらの問題を解決するため、新たな知見を発表した研究者自身がweb上で気軽にアノテーション情報を更新できるwikiベースのデータベースエンジン Twiki-genome を開発した。

このエンジンを用い、我々が決定した *Bifidobacterium* 属のゲノム情報について、世界の研究コミュニティが連携して情報交換やアノテーション情報の更新を行うための、インタラクティブなデータベース BifidoBase を作成した。

<国内外での成果の位置づけ>

ビフィズス菌の完全長のゲノム配列については、我々が公開した *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 は、ネスレ社が報告した *Bifidobacterium longum* NCC2705 に続き、二例目である。

現在、11 菌種、22 株のゲノム解析が進行中であるが、そのうち6株が、当特定領域研究によるものである。この分野のゲノム解析について世界をリードしているといえる。しかし、各国とも強力な研究体制を整え腸内細菌の研究を遂行しているため、猶予を許さない状況である。

SNP 情報については、同じ菌種について株レベルで系統的に解析を行った例はまだ報告されていない。我々の試みが最も進んでいる。是非とも TMPB の分野に於いて、世界に先駆けた研究として今後も研究を続けていく必要があると考える。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

菌株間でのゲノムの多型については、タイリングアレイをもちいて遺伝子単位での挿入欠失の解析を行った。当然のことながら、欠失については十分な情報が得られたが挿入に関しては、アレイの情報だけでは不十分である。今後、必要に応じて新たなDNAの配列情報を獲得することが必要であると考えられた。454等の新型シーケンサの利用を検討したい。

<今後の課題>

解析したゲノム配列についてフィニッシング、アノテーションが済み次第、順次公開を行う。また BifidoBase を用いて研究者コミュニティとともに情報の共有とアップデートを定期的に行う。菌株間の多型についてはロッシュ 454FLX 等の新型シーケンサの利用を検討したい。

B.adolescentis の SNP 情報については、高密度タイリングアレイを用いれば、塩基単位の変異や CDS 単位の In/Del が容易に解析できることが明らかになった。ヒト側の遺伝型、家族間の差、病歴、食習慣など様々な要因との相関が取れるよう、インフォームドコンセントを交わしたボランティアのサンプルを取得し、個々人に特有のビフィズス菌がどのように、定着—常在化していくかを説明する糸口を得たい。

<成果公表リスト>

1)論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

なし

2)データベース/ソフトウェア

1. 0701151547

Bifidobacterium adolescentis ATCC15703株の全ゲノム配列
DDBJ:[http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Bado_](http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Bado_ATCC15703)
ATCC15703 (Accession No.: NC_008618)

2. 未登録 (2008年2月末登録予定)

BifidoBase: An interactive annotation database for
Bifidobacterial genomesビフィズス菌ゲノムのアノテーション
を、WEB上で編集可能にしたwikiベースのデータベース
<http://www2.gifu-u.ac.jp/~bifidobase/>

2. 未登録 (2008年2月末登録予定)

Twiki-genome: 上記BifidoBaseを実現するためにTwikiを元に開発
したエンジン。アノテーションを共同作業で行うための汎用のプ
ラットフォーム

<http://www2.gifu-u.ac.jp/~bifidobase/Twiki-genome/>

3)共同研究

1. ゲノムシーケンシングに関しては、支援班 服部正平(東京大学大学院新領域創成科学研究科)、麻布大学 森田英利との共同研究として遂行している。

2. 自己組織化マップを用いた*Bifidobacterium adolescentis* のゲノム進化に関する解析 領域3 応用ゲノム 池村 淑道との共同研究として行っている。

3. Twiki-genomeとBifidoBaseの作成に関しては、支援班の協力を得、プログラムの作成はダイナコム社が行った。