

# 酸素耐性ビフィズス菌が有する抗酸化機構の解明

山本 裕司(北里大学 獣医学部 動物資源科学科)

連絡先: yyamamot@vmas.kitasato-u.ac.jp

**【目的】***Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*は、動物の消化管に棲息するビフィズス菌の中で酸素に耐性を示す数少ない菌種であり、そのストレス耐性の高さから生菌が必要とされるプロバイオティクスで広く利用されている。しかし、本菌のストレス耐性機構については不明な点が多い。本研究では、以下に示す2つの方法で本菌の抗酸化機構の解明を試みた。

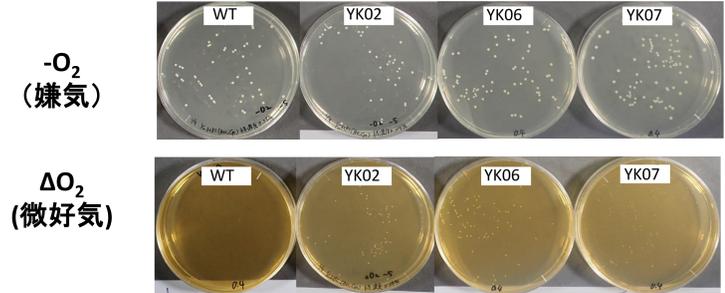
**【結果・実験1】***B. animalis*より酸素感受性株と耐性株を取得し、解析を行った。酸素感受性株については、取得した5株のうち、3株で共通して細胞壁合成系遺伝子に、1株でストレス耐性への関与が報告されている*clpP*遺伝子に変異が認められた。同定された遺伝子の野生型遺伝子をそれぞれの酸素感受性株に導入したところ、好気条件下での生育能が回復したことから、これらの遺伝子が酸素耐性に寄与していることが確認された。酸素耐性株については取得した3株のうち、2株で共通して転写制御因子*XI*に変異が見られ、酸素耐性への関与が示唆された。

**【結果・実験2】**酸素に感受性を示す*Bifidobacterium longum* 105A株に*B. animalis*のゲノムライブラリーを導入し、大気下での低温生残性を向上させる遺伝子を選抜した。その結果、生残性を向上させる遺伝子としてジヒドロ葉酸還元酵素が同定された。

## 実験1-3. 酸素耐性株の解析

### ◆酸素耐性株の性状

分離された酸素耐性株は野生株が生育できない好気条件下でもコロニーの形成が確認された。



### ◆ゲノム変異解析

ゲノム変異解析を行った結果、下記の数の変異が確認され、YK02とYK06株では共通して転写制御因子*XI*に変異が認められ、本遺伝子の変異が酸素耐性に寄与している可能性が示唆された。

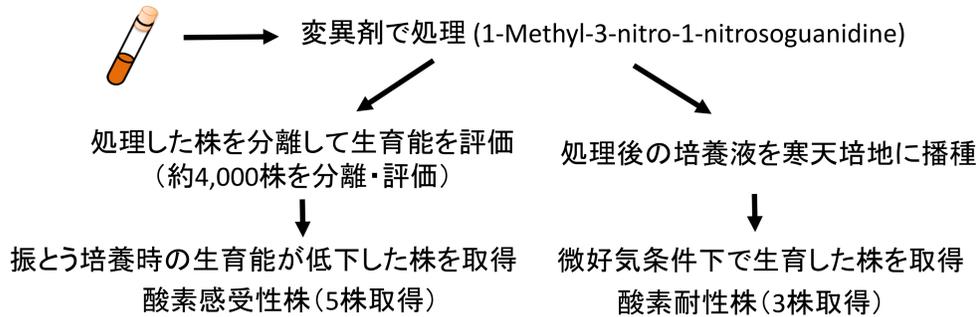
株	YK02	YK06	YK07
変異箇所	32*	10	4

\*YK02とYK06では共に転写制御因子*XI*に変異

\*YK02株については、MiSeqによって同定された変異箇所が多く、転写制御因子*XI*以外の変異についてはダイレクトシーケンスによる確認を行っていない

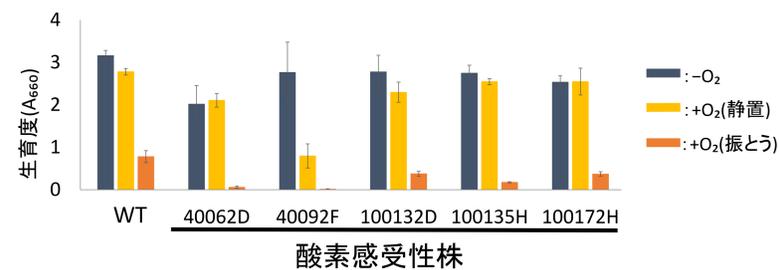
## 実験1-1. 酸素感受性株と耐性株の分離

*B. animalis* JCM10602



## 実験1-2. 酸素感受性株の解析

### ◆酸素感受性株の性状



取得した各酸素感受性株は、振とう培養時の生育度が野生株より低下していることが確認された。

### ◆ゲノム変異解析と酸素耐性に寄与する遺伝子の同定

ゲノム変異解析を行った結果、下記の数の変異が確認された(A)。ストレス耐性への関与が推定される*clpP*遺伝子と3株で共通して変異が認められた細胞壁合成系遺伝子の野生型遺伝子を各酸素感受性株に導入し、生育能を評価した。その結果、野生型遺伝子を導入した酸素感受性株では振とう培養時の生育能が向上し(B)、これらの遺伝子が酸素耐性に寄与していることが確認された。

#### A. ゲノム変異解析

株	40062D	40092F	100135H	100172H	100132D
変異箇所	10	3	6	6	21*

\*100132D株については、MiSeqによって同定された変異箇所が多く、ダイレクトシーケンスによる確認を行っていない

#### ・ストレス耐性への関与が推定される遺伝子

100135H株: Clp protease proteolytic subunit (*clpP*)

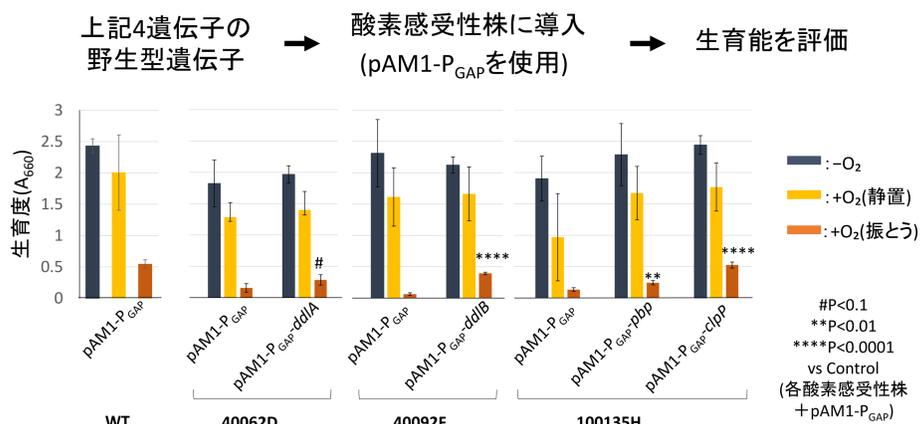
#### ・共通して変異が見られた遺伝子(細胞壁合成系遺伝子)

40062D株: D-alanyl-D-alanine ligase A (*ddlA*)

40092F株: D-alanyl-D-alanine ligase B (*ddlB*)

100135H株: Penicillin-binding protein (*pbp*)

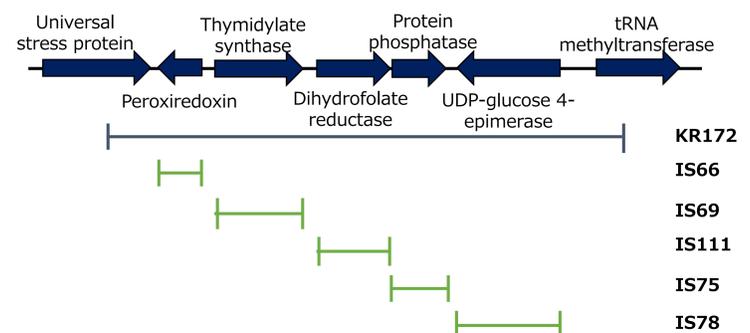
#### B. 酸素耐性に寄与する遺伝子の同定



### ◆KR172の遺伝子領域と低温生残性の向上に寄与する遺伝子の同定

取得したKR172には*B. animalis*由来の5つの遺伝子がコードされていた(A)。低温生残性の向上に寄与している遺伝子を同定するため、それぞれの遺伝子を*B. longum* 105Aに導入し、生残性を評価した。その結果、ジヒドロ葉酸還元酵素を導入したIS111株でのみ生残性の向上が確認され(B)、本遺伝子が生残性の向上に関与していることが判明した。

#### A. KR172が保有するプラスミドにコードされている遺伝子領域



#### B. 低温生残性の向上に寄与する遺伝子の同定

