

明 細 書

発明の名称： ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法

技術分野

[0001] 本発明は、ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法に関する。

背景技術

[0002] ビフィドバクテリウム属細菌は、グラム陽性の偏性嫌気性菌で、ヒトの腸内細菌叢における主要細菌であり、便秘や下痢の改善等の整腸作用、血清コレステロール上昇抑制作用、免疫賦活作用等、ヒトの健康に対して有益な作用を有することが知られている。このため、各種発酵飲食品や生菌製剤等の形態で多数の市販品が販売されている。

[0003] ビフィドバクテリウム属細菌は、同種でありながら菌株ごとに表現型及び遺伝子構成が異なることが明らかとなってきた。このような株レベルの遺伝的多様性は、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ビフィダム等の主要なヒト常在菌で普遍的に観察される。また、特定の遺伝子に注目すると、菌株間の系統関係と遺伝子の有無が一致しないことも頻繁に観察される。代表例は、長鎖キシラン類の資化性を規定するキシラナーゼ（B p X y n 1 0 A）遺伝子である。ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムのゲノム情報に基づいた正確な系統樹に、キシラナーゼ遺伝子保有株をプロットすると、特定のクラスターに集中するのではなく、系統樹全体に分散している（非特許文献1）。

[0004] 二分裂により増殖する細菌において、株レベルの遺伝子の多様性、及び系統関係と一致しない遺伝子の分布は、遺伝子水平伝播（H o r i z o n t a l G e n e T r a n s f e r ; H G T）の影響が大きいとされている。H G Tのメカニズムとしては、自然形質転換、ファージ感染、プラスミドの接合伝達が一般的である。H G Tは遺伝子及び表現型の多様性を短期的に大きく変え得るが、ビフィドバクテリウム属細菌におけるH G Tの実態は不明であり、これまでにビフィドバクテリウム属細菌で自然形質転換が生じると

の報告もない。

- [0005] また、ビフィドバクテリウム属細菌はモデル生物と比較して人工的な遺伝子操作が難しい菌種であることが知られている（非特許文献2～4）。遺伝子操作の難しさの主要因は、形質転換効率の低さにあると考えられている。よって、効率のよいビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法が求められている。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Watanabe, Y., Saito, Y., Hara, T. et al. ISME COMMUN. 1, 62, 2021.
- 非特許文献2：Vincenzo F. Brancaccio et al. Bioengineered 4:4, 197-202, 2013.
- 非特許文献3：吹谷 智, 横田 篤 化学と生物 Vol. 55, No. 9, 2017.
- 非特許文献4：S. Fukiya, T. Suzuki. et al. "Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research," Caister Academic Press, 31-51, 2011.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、効率のよいビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法を提供することに関する。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法について鋭意検討した結果、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌とドナーとしての細菌又は直鎖状DNAとを接触させ、特定の培地で静置培養することで、ドナー由来のDNAの取り込みによるビフィドバクテリウム属細菌の形質転換を効率よく行うことができることを見出した。
- [0009] すなわち、本発明は、以下の〔1〕～〔7〕を提供するものである。

〔１〕ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法であって、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌と、当該レシピエントに導入するDNAを含むドナーとしての細菌又は直鎖状DNAとを、接触させ、静置培養することを含み、当該静置培養に用いる培地がpH 6.0以上10.0未満であり、かつ当該レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 $\times$ （質量％）が、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (\text{pH}) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ を満たす培地である、方法。

〔２〕ビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法であって、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌と、ドナーとしての直鎖状DNAとを、接触させ、静置培養することを含み、当該静置培養に用いる培地がpH 6.0以上10.0未満であり、かつ当該レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 $\times$ （質量％）が、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (\text{pH}) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ を満たす培地であり、当該レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌がupp遺伝子を有さないビフィドバクテリウム属細菌であり、

当該ドナーとしての直鎖状DNAが上流ホモロジーアーム、選択マーカー遺伝子及びupp遺伝子の２種の遺伝子、並びに下流ホモロジーアームを含み、当該２種の遺伝子は当該上流ホモロジーアーム及び当該下流ホモロジーアームの間に配置され、かつ当該２種の遺伝子と当該下流ホモロジーアームの間に当該上流ホモロジーアームの3'末端領域を含むか、当該上流ホモロジーアームと当該２種の遺伝子の間に当該下流ホモロジーアームの5'末端領域を含む、方法。

〔３〕前記レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌がTad線毛遺伝子オペロン、DNA結合酵素（ComEA）遺伝子／DNA取り込み酵

素 (C o m E C) 遺伝子オペロン、DNA プロセッシング酵素 (D p r A) 遺伝子、ヌクレアーゼ (Y r a N) 遺伝子及びヘリカーゼ (C o m M) 遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 種をゲノム上に有するビフィドバクテリウム属細菌である、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔4〕前記培地の浸透圧が 1 1 0 ~ 7 5 0 m O s m である、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔5〕前記培地が M g C l₂ を 3 ~ 1 8 0 m M 含有する、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔6〕〔1〕記載のビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法又は〔2〕記載のビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法に用いられる培地であって、p H 6. 0 以上 1 0. 0 未満であり、かつレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 x (質量%) が、p H が 6. 0 以上 8. 5 未満の場合に $0 < x \leq 0. 2 \times (p H) - 1. 2$ 、p H が 8. 5 以上 1 0. 0 未満の場合に $0. 2 \times (p H) - 1. 7 < x \leq 0. 2 \times (p H) - 1. 2$ を満たす、培地。

〔7〕〔2〕記載のビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法に用いられるキットであって、p H 6. 0 以上 1 0. 0 未満であり、かつレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 x (質量%) が、p H が 6. 0 以上 8. 5 未満の場合に $0 < x \leq 0. 2 \times (p H) - 1. 2$ 、p H が 8. 5 以上 1 0. 0 未満の場合に $0. 2 \times (p H) - 1. 7 < x \leq 0. 2 \times (p H) - 1. 2$ を満たす培地、並びに選択マーカー遺伝子及び u p p 遺伝子を含む直鎖状 DNA を含有するキット。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、従来形質転換が難しいとされていたビフィドバクテリウム属細菌の形質転換を効率よく行うことができ、ビフィドバクテリウム属細菌に対する任意のゲノム領域の編集や、ビフィドバクテリウム属細菌に対する新規表現型の付与といった既存プロバイオティクス株の育種が可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムのキシラナーゼ遺伝子獲得株（形質転換体）のゲノム構造の一例。各株で対応する一塩基多型（SNPs）を灰色線で示す。

[図2]ドナー（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11027）、レシピエント（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11956）、及び遺伝子獲得株（形質転換体）のmPY-A X培地における増殖曲線。

[図3]ドナー（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11027）、レシピエント（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11956）、及び遺伝子獲得株（形質転換体）のmPY-Starch培地における増殖曲線。

[図4]ドナー（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 4072^T）、レシピエント（ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 12824）、及び遺伝子獲得株（形質転換体）のTc-mGAML培地におけるコロニー形成。

[図5]ドナーとして（A）生菌体又は死菌体、（B）生菌体、ゲノムDNA又はPCR産物、（C）DNase処理した生菌体を用いた場合の形質転換頻度。

[図6]（A）pH、（B）ラクトース、（D）各種塩、（E）塩化マグネシウム、（F）浸透圧、（G）培養条件が形質転換に与える影響。n. d. は非検出（not detected）を示す。（C）形質転換が生じる糖とpHの範囲。（H）市販培地における形質転換。

[図7]マーカーレスゲノム操作系の概略図。

[図8]（A）ビフィドバクテリウム・ブレーベの遺伝子獲得株（形質転換体）のゲノム構造の一例。（B）ビフィドバクテリウム・ロンガムの遺伝子獲得株（形質転換体）のゲノム構造の一例。（C）異菌種からの遺伝子獲得株（形質転換体）のゲノム構造の一例。一塩基多型を灰色線で示す。

[図9] (A) ドナー (ビフィドバクテリウム・ブレーベ BR-Cw104-C2株)、レシピエント (ビフィドバクテリウム・ブレーベ BR-Cw104-A1株)、及び遺伝子獲得株 (形質転換体) の E m - m G A M L におけるコロニー形成。(B) ドナー (ビフィドバクテリウム・ロンガム YIT 12812)、レシピエント (ビフィドバクテリウム・ロンガム YIT 12762)、及び遺伝子獲得株 (形質転換体) の E m - m G A M L におけるコロニー形成。(C) ドナー (ビフィドバクテリウム・ロンガム L0-Cw098-B4株)、レシピエント (ビフィドバクテリウム・ブレーベ BR-Cw104-A1株)、及び遺伝子獲得株 (形質転換体) の E m - m G A M L 培地におけるコロニー形成。

[図10] ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム株のグルコースを唯一の糖源とする培地における増殖性。

発明を実施するための形態

- [0012] 本明細書における塩基配列、核酸などの略号による表示は、I U P A C - I U B 規定 (IUPAC-IUB communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138:9-37, 1984)、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作製のためのガイドライン」(特許庁編)などの、当該分野で慣用される記号で記載されている。本明細書において「デオキシリボ核酸 (DNA)」は、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖という各1本鎖DNAを包含する。
- [0013] 本明細書において、塩基配列の同一性は、比較すべき2つの核酸配列の塩基ができるだけ多く一致するように両塩基配列を整列させ、一致した塩基数を全塩基数で除したものを百分率で表したものである。当業者であれば、BLAST、ClustalXやGenetyxといったソフトウェアのパラメーターを適当に設定し、塩基配列の同一性を決定することができる。
- [0014] 本明細書において、「ヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、核酸と同義であって、DNA及びRNAの両方を含むものとする。当該DNAには、cDNA、ゲノムDNA及び合成DNAのいずれもが含まれる。また当該RNAには、total RNA、mRNA、

rRNA及び合成のRNAのいずれもが含まれる。また、「ヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は2本鎖であっても1本鎖であってもよく、ある配列を有する「ヌクレオチド」（又は「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」）といった場合、特に言及しない限り、これに相補的な配列を有する「ヌクレオチド」（又は「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」）も包括的に意味するものとする。

[0015] 本明細書において、「遺伝子」とは、ゲノムDNAを含む2本鎖DNAの他、cDNAを含む1本鎖DNA（正鎖）、当該正鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（相補鎖）、及びこれらの断片を包含するものであって、DNAを構成する塩基の配列情報の中に、何らかの生物学的情報が含まれているものを意味する。「遺伝子」とは、特に言及しない限り、制御領域、コード領域、エキソン、及びイントロンを区別することなく示すものとする。

[0016] 本明細書において、第一の遺伝子及び第二の遺伝子との「発現可能な連結」とは、第一の遺伝子と第二の遺伝子とが、適切な細菌のゲノムに導入された場合に、第一の遺伝子がコードするタンパク質と第二の遺伝子がコードするタンパク質がそれぞれ生産されるように連結されることをいう。ここで、「連結」とは、第一の遺伝子と第二の遺伝子が直接結合している場合も、他の塩基配列を介して結合している場合も含む概念である。第一の遺伝子と第二の遺伝子との「発現可能な連結」の手順は当業者に周知である。

[0017] 本明細書において、遺伝子又はその塩基配列に関する「上流」及び「下流」とは、当該遺伝子の転写方向の上流及び下流をいう。例えば、遺伝子の「上流配列」「下流配列」とは、それぞれDNAセンス鎖において該遺伝子の5'側及び3'側に位置する配列をいう。

[0018] 本明細書において、「形質転換」とは、エレクトロポレーション等に代表される物理化学的な処理に依らず、細菌が細菌外のDNAを細胞内に取り込んで自身のゲノムDNA内に保持する自然形質転換を指す。本明細書において、「ドナー」とは、DNAの供与者を指し、「レシピエント」とは、該DNAの受容者を指す。

[0019] 本発明のビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法（以下、本発明の方法とも称する）は、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌と、当該レシピエントに導入するDNAを含むドナーとしての細菌又は直鎖状DNAとを、接触させ、静置培養することを含み、当該静置培養に用いる培地がpH6.0以上10.0未満であり、かつ当該レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 x （質量%）が、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (\text{pH}) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ を満たす培地である、方法である。

[0020] 本発明の方法において、形質転換の対象となるビフィドバクテリウム属細菌、換言すればレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌の種は、特に限定されず、例えば、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム（*Bifidobacterium pseudocatenuatum*）、ビフィドバクテリウム・ブレーベ（*B. breve*）、ビフィドバクテリウム・ロンガム（*B. longum*）、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス（*B. adolescentis*）、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（*B. bifidum*）、ビフィドバクテリウム・アニマリス（*B. animalis*）、ビフィドバクテリウム・ズイス（*B. suis*）、ビフィドバクテリウム・インファンティス（*B. infantis*）、ビフィドバクテリウム・カテヌラータム（*B. catenuatum*）、ビフィドバクテリウム・ラクチス（*B. lactis*）、ビフィドバクテリウム・グロボサム（*B. globosum*）、ビフィドバクテリウム・アンギュラータム（*B. angulatum*）、ビフィドバクテリウム・デンティウム（*B. dentium*）等が挙げられる。なかでも、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス、又はビフィドバクテリウム・ビフィダムが好ましく、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、又はビフィドバ

クテリウム・ロンガムがより好ましい。

[0021] レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌は、T a d線毛遺伝子オペロン、DNA結合酵素 (C o m E A) 遺伝子／DNA取り込み酵素 (C o m E C) 遺伝子オペロン、DNAプロセッシング酵素 (D p r A) 遺伝子、ヌクレアーゼ (Y r a N) 遺伝子及びヘリカーゼ (C o m M) 遺伝子からなる群より選択される好ましくは少なくとも1種、より好ましくは少なくとも3種、さらに好ましくは全5種をゲノム上に有するビフィドバクテリウム属細菌である。後記実施例に示すように、T a d線毛遺伝子オペロン、DNA結合酵素 (C o m E A) 遺伝子／DNA取り込み酵素 (C o m E C) 遺伝子オペロン、DNAプロセッシング酵素 (D p r A) 遺伝子、ヌクレアーゼ (Y r a N) 遺伝子及びヘリカーゼ (C o m M) 遺伝子は、いずれもビフィドバクテリウム・シュードカタヌラータムにおいて本発明の方法による形質転換頻度と発現量が関連する遺伝子として見出され、各遺伝子の破壊株を用いた検証により自然形質転換への寄与が確認された遺伝子である。各遺伝子の推定遺伝子産物及び配列番号、並びに各オペロン又は各遺伝子の推定機能を表1に示す。レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌がそのゲノム上に保有する各オペロン又は各遺伝子としては、表1に示す配列番号で示される塩基配列からなるオペロン又は遺伝子だけでなく、それに相当するオペロン又は遺伝子も包含される。ここで、「相当するオペロン」とは、ある細菌において所定の機能を有するタンパク質群をコードするオペロンに対して、別の細菌において当該タンパク質群と同じ又は類似の機能を有するタンパク質群をコードするオペロンをいい、「相当する遺伝子」とは、ある細菌において所定の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子に対して、別の細菌において当該タンパク質と同じ又は類似の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子をいう。あるオペロンとそれに相当するオペロン、又はある遺伝子とそれに相当する遺伝子は、同じ塩基配列を有していてもよく、異なる塩基配列を有していてもよいが、あるオペロンとそれに相当するオペロン、又はある遺伝子とそれに相当する遺伝子の塩基配列の同一性は70%以

上が好ましく、80%以上がより好ましく、90%以上がさらに好ましく、95%以上がさらに好ましく、99%以上がさらに好ましい。

[0022] [表1]

遺伝子ID	換置遺伝子産物 (KEGG orthology (or eggNOG description))	推定機能	配列番号
YIT12819_00143	flhG, flhG; flagellar biosynthesis protein	Tad線毛形成 (細胞外DNA結合)	1
YIT12819_00144	cpaF, tadA; pilus assembly protein		2
YIT12819_00145	tadB; tight adherence protein B		3
YIT12819_00146	tadC; tight adherence protein C		4
YIT12819_00147	(Protein of unknown function (DUF4244))		5
YIT12819_00148	tadE; tight adherence protein E		6
YIT12819_00149	(TIGRFAM helicase secretion neighborhood TadE-like protein)		7
YIT12819_00675	dprA; DNA processing protein	相同組み換え促進	8
YIT12819_00676	comM; magnesium chelatase family protein	核膜解離 (ComMヘリカーゼ)	9
YIT12819_00677	yanN; putative endonuclease	DNA一本鎖化ヌクレアーゼ	10
YIT12819_00905	comEA; competence protein	DNA結合・取り込み	11
YIT12819_00906	comEC; competence protein		12

[0023] レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌は、対数増殖期又は定常期の生菌を用いるのが好ましい。生菌は、細菌の種菌を増殖可能な培地に接種して所定の期間培養する手段を用いて調製することができる。適宜、培養した後、遠心分離、ろ過などの手段で菌体を単離・精製しても良い。

[0024] 本発明の方法において、ドナーとしての細菌は、レシピエントに導入するDNAを含む限り特に限定されず、いずれの属及び種に属する細菌であってもよいが、好ましくは放線菌門に属する細菌であり、より好ましくはビフィドバクテリウム目細菌であり、さらに好ましくはビフィドバクテリウム属細菌であり、さらに好ましくはレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌と同種の細菌である。ドナーとしてのビフィドバクテリウム属細菌の種としては、上記のレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌として例示した種と同様の種が挙げられる。

[0025] ドナーとしての細菌は、生菌であっても死菌であってもよいが、操作性の観点から死菌が好ましい。生菌としては、対数増殖期又は定常期の生菌を用いるのが好ましい。生菌は、細菌の種菌を増殖可能な培地に接種して所定の期間培養した後、遠心分離、ろ過などの菌体を単離・精製する手段を用いて調製することができる。死菌は、生菌に加熱処理、アルコール処理等を施すことで調製することができる。

[0026] ドナーとしての細菌に含まれるレシピエントに導入するDNAは、当該細菌のゲノム上の任意の領域のDNAであり得る。好ましくは、レシピエント

に導入するDNAは、遺伝子を含む。レシピエントに導入するDNAの長さは、特に制限されないが、好ましくは3～100kbであり、より好ましくは5～30kbであり、さらに好ましくは10～20kbである。

[0027] 本発明の方法においては、ドナーとして、レシピエントに導入するDNAを含む直鎖状DNAを用いることもできる。ドナーとしての直鎖状DNAは、天然から単離されたものであっても、合成されたものであっても、あるいは遺伝子工学的手法を用いて産生されたものであってもよい。直鎖状DNAとしては、例えば、PCR産物、cDNA、ゲノムDNA、これらの断片等が挙げられ、操作性の点から、PCR産物が好ましく用いられる。

[0028] ドナーとしての直鎖状DNA中のレシピエントに導入するDNAは、任意のDNAであり得る。好ましい一実施形態において、レシピエントに導入するDNAは、遺伝子を含む。一例において、レシピエントに導入するDNAは、プロモーター、遺伝子の塩基配列、及びターミネーターからなる発現カセットである。発現カセットは、オペレーター、エンハンサー、リボソーム結合部位等の制御領域を含んでいてもよい。別の好ましい一実施形態において、レシピエントに導入するDNAは、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の標的DNA領域との置換により当該標的DNA領域に変異（例えば、欠失、置換、挿入、又は付加）を導入するためのDNAを含む。斯かるDNAは、当該標的DNA領域の塩基配列の一部を所望の変異に応じて改変した塩基配列からなる。さらに、ドナーとしての直鎖状DNAは、必要に応じて、当業者に公知の各種の配列（例えば、制限酵素切断部位、シグナル配列）、選択マーカー遺伝子等を含んでいてもよい。形質転換体の選抜を容易にする点から、直鎖状DNAには選択マーカー遺伝子を含むことが好ましい。選択マーカー遺伝子としては、テトラサイクリン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子が挙げられる。あるいは、生育のために特定の代謝を必須とする選択培地を用いる場合、該

代謝の関連遺伝子を選択マーカーとして用いてもよい。このような代謝関連遺伝子としては、長鎖キシラン類の資化性を規定するキシラナーゼ遺伝子、スターチの資化性を規定するアミラーゼ遺伝子等が挙げられる。これらの各種配列又は要素は、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌、形質転換後の培養培地等の条件に応じて、当業者が適宜選択して使用することができる。レシピエントに導入するDNAの長さは、特に制限されないが、好ましくは3～100 kbであり、より好ましくは5～30 kb、さらに好ましくは10～20 kbである。

[0029] ドナーとしての直鎖状DNAは、レシピエントに導入するDNAの導入位置又は領域の制御の点から、好ましくは、レシピエントに導入するDNAの上流及び下流に相同組み換えのための上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジーアームをさらに含む。上流ホモロジーアームは、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の標的DNA導入位置又は領域の上流領域（好ましくは隣接上流領域）の塩基配列と相同な塩基配列からなり、下流ホモロジーアームは、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の標的DNA導入位置又は領域の下流領域（好ましくは隣接下流領域）の塩基配列と相同な塩基配列からなる。各ホモロジーアームの塩基配列と対応するレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の領域の塩基配列の同一性は、それぞれ独立して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは96%以上、さらに好ましくは97%以上、さらに好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、さらに好ましくは100%である。各ホモロジーアームの長さは、特に制限されないが、相同組み換え効率及び操作性の点から、それぞれ独立して、好ましくは0.5～5 kb、より好ましくは0.8～4 kb、さらに好ましくは1～3 kbである。斯かるドナーとしての直鎖状DNAは、通常、5'側から順に上流ホモロジーアーム、レシピエントに導入するDNA、及び下流ホモロジーアームを含み、5'側から順に上流ホモロジーアームの塩基配列、レシピエントに導入するDNAの塩基配列、及び下流ホ

モロジューアームの塩基配列を含むが、形質転換効率を損なわない限りにおいて、上流ホモロジューアームの塩基配列の上流、上流ホモロジューアームの塩基配列とレシピエントに導入するDNAの塩基配列の間、レシピエントに導入するDNAの塩基配列と下流ホモロジューアームの塩基配列の間、及び下流ホモロジューアームの塩基配列の下流からなる群より選択される少なくとも1つの位置に任意の塩基配列が付加されていてもよい。

[0030] 本発明の方法で用いる培地は、pHが6.0以上10.0未満であり、かつレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 x （質量%）が、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (pH) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (pH) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (pH) - 1.2$ を満たす培地である。培地は、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌、好ましくはレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌及びドナーとしての細菌が良好に生存可能な培地であればよく、pH及び糖類の含有量が上記範囲である限り、その他の組成は特に制限されない。培地は、固体培地であっても液体培地であってもよいが、形質転換効率の点から、好ましくは固体培地である。

[0031] 培地のpHは、6.0以上10.0未満である。pHはオートクレーブ等による加熱滅菌前、25℃におけるpHをいう。培地のpHは、形質転換効率の点から、好ましくは9.5以下であり、より好ましくは9.2以下である。培地のpHの範囲は、好ましくは6.0～9.5であり、より好ましくは6.0～9.2である。

[0032] 培地には、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌、好ましくはレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌及びドナーとしての細菌、が資化可能な糖類を含有していてよいが、その含有量 x （質量%）は、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (pH) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (pH) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (pH) - 1.2$ を満たす量である。レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 x （質量%）が当該範囲外の

場合、良好な形質転換が生じない。当該糖類としては、典型的にはラクトース、グルコース、各種オリゴ糖等が挙げられる。

通常、ビフィドバクテリウム属細菌の培養に使用される培地（例えば、TOS培地、MRS培地、BL培地）には、ビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類が1～2質量％程度含有されることが多く、この含有量は本発明の培地におけるレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量の上限を超える。本発明においては、意外にも、ビフィドバクテリウム属細菌の増殖に悪影響を及ぼす可能性がある糖類含有量が低い培地を使用することにより効率よい形質転換が可能となる。

[0033] 培地の浸透圧は、特に制限されないが、形質転換効率の点から、110～750mOsmが好ましく、120～720mOsmがより好ましく、130～700mOsmがさらに好ましい。ここで、浸透圧は、寒天等のゲル化剤を添加しない状態で加熱して構成成分を溶解させた状態の培地の浸透圧を指す。浸透圧は、本分野で公知の手段により測定すればよく、例えば、第十八改正日本薬局方に記載の浸透圧測定法（オスモル濃度測定方法）に準じて測定することができる。

[0034] 培地には、形質転換効率の点から、MgCl₂を適度に含有するのが好ましい。培地におけるMgCl₂の含有量は、3～180mMが好ましく、5～100mMがより好ましい。

[0035] 本発明の方法で用いる培地としては、市販の培地を使用してもよく、例えば、変法GAM培地（日水製薬株式会社）（グルコース0.05質量％、pH7.3、浸透圧289mOsm（実測値））、クックドミート培地（OXOID社）（グルコース0.2質量％、pH7.2±0.2、浸透圧250mOsm（実測値））等が挙げられる。

[0036] レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌とドナーとしての細菌又は直鎖状DNAとを接触させる手段は、培地の種類、ドナーの種類等に応じて適宜選択すればよく、特に制限されない。例えば、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌の前培養液にドナーとしての細菌の前培養液

又は直鎖状DNAを添加する方法、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌にドナーとしての細菌又は直鎖状DNAを直接添加、塗布、散布もしくは噴霧する方法が挙げられ、この場合、接触させたレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌とドナーとしての細菌又は直鎖状DNAは、上記の形質転換のための培地に添加し、静置培養に供すればよい。あるいは、例えば、上記の形質転換のための培地にレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌の前培養液とドナーとしての細菌の前培養液又は直鎖状DNAとをともに添加する方法、上記の形質転換のための培地にレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌とドナーとしての細菌又は直鎖状DNAとをともに添加する方法が挙げられ、この場合、接触させたレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌とドナーとしての細菌又は直鎖状DNAは、そのまま静置培養に供すればよい。

[0037] 本発明の方法で用いるレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌の菌量及びドナーとしての細菌の菌量は、特に制限されないが、それぞれ独立して、 $10^5 \sim 10^9$ 個が好ましく、 $10^6 \sim 10^8$ 個がより好ましい。レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌の菌量とドナーとしての細菌の菌量比は、特に制限されないが、 $1 : 0.5 \sim 1.5$ が好ましく、 $1 : 0.8 \sim 1.2$ がより好ましい。本発明の方法で用いるドナーとしての直鎖状DNAの量は、特に制限されないが、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌の菌量 10^7 個あたり、 $0.01 \text{ pg} \sim 1000 \text{ ng}$ が好ましく、 $100 \text{ pg} \sim 100 \text{ ng}$ がより好ましい。

[0038] 次いで、接触させたレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌とドナーとしての細菌又は直鎖状DNAは、上記の形質転換のための培地で静置培養する。培養温度は、 $25 \sim 46^\circ\text{C}$ 、好ましくは $35 \sim 42^\circ\text{C}$ 、培養時間は、 $3 \sim 30$ 時間、好ましくは $4 \sim 24$ 時間、より好ましくは $8 \sim 16$ 時間とすればよい。また、培養雰囲気は好気的な条件であっても嫌気的な条件であってもよいが、嫌気的な条件で行うことが好ましい。

[0039] ドナーに含まれるレシピエントに導入するDNAは、相同組み換えにより

、レシピエントのゲノムに導入され、特に、ドナーとしての直鎖状DNAがレシピエントに導入するDNAに加えて上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジーアームを含む場合、直鎖状DNAに含まれるレシピエントに導入するDNAは、相同組み換えにより、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の標的DNA導入位置又は領域に導入される。よって、本発明の方法により、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノムの操作が可能となる。後記実施例に示すレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌の遺伝子発現解析の結果から、レシピエントの線毛が菌体外のドナーのDNAをキャプチャする、二本鎖DNAを一本鎖化する酵素の働きによりキャプチャしたDNAを一本鎖化する、一本鎖DNAをDNA取り込み酵素が菌体内に輸送する、一本鎖DNA結合タンパク質が一本鎖DNAを認識し、組み換え酵素を呼び込む、レシピエントのゲノム中で相同組み換えが生じる、とのメカニズムにより、ドナーからレシピエントにドナー由来のDNAが導入されると推測される。

[0040] 本発明の方法により得られる目的の形質転換体は、導入するDNAに応じた手法で取得することができる。例えば、静置培養後の菌体を目的の形質転換体が生存可能な培地にて適宜培養し、得られるクローンから、PCRによってDNAの導入が確認されたクローンを目的の形質転換体として選抜する方法、静置培養後の菌体を目的の形質転換体が生存可能な培地にて適宜培養し、得られるクローンから、ゲノム解析によりDNAが導入されたクローンを目的の形質転換体として選抜する方法、静置培養後の菌体を選択マーカーに応じた薬剤を添加した選択培地で適宜培養し、得られるクローンを目的の形質転換体として選抜する方法等が挙げられる。ここで、静置培養後の菌体の培養は、ビフィドバクテリウム属細菌の通常の培養条件にて行えばよい。すなわち、培地に接種するビフィドバクテリウム属細菌に適した接種量、温度、時間、培養雰囲気等の各種条件を適宜設定して行えばよい。例えば、接種量は、0.01～5%、好ましくは0.1～1%、培養温度は、25～46℃、好ましくは35～42℃、培養時間は6～120時間、好ましくは2

4～72時間とすればよい。また、培養雰囲気は好気的な条件であっても嫌気的な条件であってもよいが、嫌気的な条件で行うことが好ましい。

[0041] 本発明の方法により、ビフィドバクテリウム属細菌において、目的遺伝子の発現の増強を効率よく行うことが可能となる。

目的遺伝子の発現を増強する手法としては、例えば、本発明の方法によりレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノムに目的遺伝子を導入することによって目的遺伝子のコピー数を増やす方法、本発明の方法によりレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の目的遺伝子の制御領域又は制御遺伝子を改変し、mRNAへの転写量を増やす方法等が挙げられる。

[0042] また、本発明の方法により、ビフィドバクテリウム属細菌において、目的遺伝子の発現の阻害又は抑制を効率よく行うことが可能となる。

目的遺伝子の発現を阻害する手法としては、例えば、本発明の方法によりレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の目的遺伝子の内部に全く別のDNAを挿入する方法、本発明の方法によりレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の目的遺伝子の一部又は全部を欠失させる方法等が挙げられる。

目的遺伝子の発現を抑制する手法としては、例えば、本発明の方法によりレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の目的遺伝子の制御領域又は制御遺伝子を改変し、mRNAへの転写量を減らす方法等が挙げられる。

[0043] さらに、本発明の方法は、uracil phosphoribosyl transferase (UPRTase) をコードするupp遺伝子を有さないビフィドバクテリウム属細菌をレシピエントとして用い、上流ホモロジアーーム、選択マーカ－遺伝子及びupp遺伝子の2種の遺伝子、並びに下流ホモロジアーームを含み、当該2種の遺伝子が当該上流ホモロジアーーム及び当該下流ホモロジアーームの間に配置され、かつ当該2種の遺伝子と当該下流ホモロジアーームの間に当該上流ホモロジアーームの3'末端領域

を含むか、当該上流ホモロジーマームと当該2種の遺伝子の間に当該下流ホモロジーマームの5'末端領域を含む直鎖状DNAをドナーとして用いることにより、ビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作を行うことができる。このとき、選択マーカー遺伝子及びupp遺伝子の2種の遺伝子が、レシピエントに導入するDNAに相当する。

すなわち、本発明のビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法は、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌と、ドナーとしての直鎖状DNAとを、接触させ、静置培養することを含み、当該静置培養に用いる培地がpH6.0以上10.0未満であり、かつ当該レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 $\times$ （質量%）が、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (\text{pH}) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ を満たす培地であり、当該レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌がupp遺伝子を有さないビフィドバクテリウム属細菌であり、当該ドナーとしての直鎖状DNAが上流ホモロジーマーム、選択マーカー遺伝子及びupp遺伝子の2種の遺伝子、並びに下流ホモロジーマームを含み、当該2種の遺伝子は当該上流ホモロジーマーム及び当該下流ホモロジーマームの間に配置され、かつ当該2種の遺伝子と当該下流ホモロジーマームの間に当該上流ホモロジーマームの3'末端領域を含むか、当該上流ホモロジーマームと当該2種の遺伝子の間に当該下流ホモロジーマームの5'末端領域を含む、方法である。

[0044] ここで、選択マーカー遺伝子は、選択マーカー遺伝子及びupp遺伝子の2種の遺伝子が導入された菌株を選抜（ポジティブセクション）するためのポジティブセクションマーカーであり、上記の薬剤耐性遺伝子又は代謝関連遺伝子が好適に用いられる。一方、upp遺伝子は、選択マーカー遺伝子及びupp遺伝子の2種の遺伝子が脱落した菌株を選抜（ネガティブセクション）するためのネガティブセクションマーカーである。upp遺伝子がコードするUPRTaseは、5-fluorouracil（5FU

) を 5-fluorouridine monophosphate に変換するが、これは最終的に 5-fluoro-dUMP に変換される。5-fluoro-dUMP は、毒性の代謝産物であるため、upp 遺伝子を有さない菌株は 5FU 存在下で死滅しないのに対し、upp 遺伝子を有する菌株は 5FU 存在下で死滅する。よって、5FU 存在下で upp 遺伝子は致死性のネガティブセレクションマーカーとして機能する。ビフィドバクテリウム・シュドカテヌラータムの upp 遺伝子の塩基配列を配列番号 13 に示す。本発明において、upp 遺伝子としては、配列番号 13 で示される塩基配列からなる遺伝子だけでなく、それに相当する遺伝子も包含する。ここで、「相当する遺伝子」とは、ある細菌において UPRase と同じ又は類似の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子をいう。配列番号 13 で示される塩基配列からなる upp 遺伝子とそれに相当する遺伝子は、同じ塩基配列を有していてもよく、異なる塩基配列を有していてもよいが、塩基配列の同一性は 70% 以上が好ましく、80% 以上がより好ましく、90% 以上がさらに好ましく、95% 以上がさらに好ましく、99% 以上がさらに好ましい。

[0045] ドナーとしての直鎖状 DNA において、選択マーカー遺伝子及び upp 遺伝子は、発現可能に連結されている限り、直接連結されていても、他の塩基配列を介して連結されていてもよく、遺伝子の連結順序は特に制限されない。好ましくは、ドナーとしての直鎖状 DNA は、プロモーター、選択マーカー遺伝子の塩基配列、及びターミネーターからなる選択マーカー遺伝子の発現カセット、並びにプロモーター、upp 遺伝子の塩基配列、及びターミネーターからなる upp 遺伝子の発現カセットを含む。発現カセットは、オペレーター、エンハンサー、リボソーム結合部位等の制御領域を含んでいてもよい。

[0046] ドナーとしての直鎖状 DNA は、上流ホモロジーアーム、選択マーカー遺伝子及び upp 遺伝子の 2 種の遺伝子（以下、まとめてマーカー遺伝子群と称する）、及び下流ホモロジーアームを含む。上流ホモロジーアームは、レ

シピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の標的DNA導入位置又は領域の上流領域（好ましくは隣接上流領域）の塩基配列と相同な塩基配列からなり、下流ホモロジーアームは、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の標的DNA導入位置又は領域の下流領域（好ましくは隣接下流領域）の塩基配列と相同な塩基配列からなる。ドナーとしての直鎖状DNAにおいて、マーカー遺伝子群は上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジーアームの間に配置され、マーカー遺伝子群と下流ホモロジーアームの間に上流ホモロジーアームの3'末端領域をダイレクトリピートとして含むか、上流ホモロジーアームとマーカー遺伝子群の間に下流ホモロジーアームの5'末端領域をダイレクトリピートとして含む。各ホモロジーアームの塩基配列と対応するレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の領域の塩基配列の同一性は、それぞれ独立して、少なくとも80%、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは96%以上、さらに好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、さらに好ましくは100%である。各ホモロジーアームの長さは、特に制限されないが、相同組み換え効率の点から、それぞれ独立して、好ましくは0.5~5 kb、より好ましくは0.8~4 kb、さらに好ましくは1~3 kbである。ダイレクトリピートの長さは、特に制限されないが、相同組み換え効率の点から、好ましくは15~100 bp、より好ましくは30~70 bp、さらに好ましくは45~60 bpである。斯かるドナーとしての直鎖状DNAは、通常、5'側から順に上流ホモロジーアーム、マーカー遺伝子群、ダイレクトリピート、及び下流ホモロジーアームを含み、5'側から順に上流ホモロジーアームの塩基配列、マーカー遺伝子群の塩基配列、ダイレクトリピートの塩基配列、及び下流ホモロジーアームの塩基配列を含むか、上流ホモロジーアーム、ダイレクトリピート、マーカー遺伝子群、及び下流ホモロジーアームを含み、5'側から順に上流ホモロジーアームの塩基配列、ダイレクトリピートの塩基配列、マーカー遺伝子群の塩基配列、及び下流ホモロジーアームの塩基配列を

含むが、形質転換効率を損なわない限りにおいて、上流ホモロジーアームの上流、上流ホモロジーアームとマーカー遺伝子群の間、マーカー遺伝子群とダイレクトリピートの間、及び下流ホモロジーアームの下流からなる群より選択される少なくとも1つの位置か、上流ホモロジーアームの上流、ダイレクトリピートとマーカー遺伝子群の間、マーカー遺伝子群と下流ホモロジーアームの間、及び下流ホモロジーアームの下流からなる群より選択される少なくとも1つの位置に任意の塩基配列が付加されていてもよい。

[0047] ゲノム操作の対象となるレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌は、u p p 遺伝子を有さない。よって、レシピエントに導入されるドナー由来のu p p 遺伝子がネガティブセクションマーカーとして機能することができる。u p p 遺伝子を有さないビフィドバクテリウム属細菌は、内在性のu p p 遺伝子を有さないビフィドバクテリウム属細菌であってもよい、本発明の形質転換方法又は公知の方法によりu p p 遺伝子が破壊（例えば欠失）されたビフィドバクテリウム属細菌であってもよい。ビフィドバクテリウム属細菌の種としては、上記同様のものが挙げられる。

[0048] 本発明のビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法において、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌と、ドナーとしての直鎖状DNAとを接触させる手段、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌の菌量、ドナーとしての直鎖状DNAの量、培地、静置培養の態様は、本発明のビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法の場合と同様である。

[0049] ドナーに含まれるマーカー遺伝子群は、相同組み換えにより、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の標的DNA導入位置又は領域に導入される。マーカー遺伝子群が導入された形質転換体は、選択マーカー遺伝子の種類に応じた手法で取得することができる（ポジティブセクション）。例えば、静置培養後の菌体を選択マーカーに応じた薬剤を添加した選択培地で適宜培養し、得られるクローンを目的の形質転換体として選抜する方法が挙げられる。次いで、マーカー遺伝子群が導入された形質転換体を5FU含有培地で培養することで、ダイレクトリピート間で相同組み換

えが生じ、マーカー遺伝子群がゲノムから脱落した結果、5FU含有培地で増殖可能となった目的の形質転換体を取得することができる（ネガティブセクション）。よって、本発明のビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法は、選択マーカーの機能発現（抗生物質耐性等）を指標としてマーカー遺伝子群が導入された形質転換体を選抜すること、及び選抜された形質転換体から5FUに対する感受性を指標としてマーカー遺伝子群が脱落した形質転換体を選抜することをさらに含んでもよい。5FU含有培地中の5FU濃度は、50～500mMが好ましく、50～200mMがより好ましい。菌体の培養は、ビフィドバクテリウム属細菌の通常の培養条件にて行えばよい。

[0050] 本発明のビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法によれば、ビフィドバクテリウム属細菌のゲノムをマーカー遺伝子の痕跡を残さずに改変するマーカーレスゲノム操作が可能となる。ゲノム操作としては、欠失、置換、挿入等が挙げられる。例えば、欠失であれば、上流ホモロジーアーム、マーカー遺伝子群、及び下流ホモロジーアームを含み、当該マーカー遺伝子群が当該上流ホモロジーアーム及び当該下流ホモロジーアームの間に配置され、かつ当該マーカー遺伝子群と当該下流ホモロジーアームの間に当該上流ホモロジーアームの3'末端領域をダイレクトリピートとして含むか、当該上流ホモロジーアームと当該マーカー遺伝子群の間に当該下流ホモロジーアームの5'末端領域をダイレクトリピートとして含む直鎖状DNAを用いればよい。この場合、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の標的DNA領域が欠失される。欠失される標的DNA領域の長さは、特に制限されないが、好ましくは1～10000bp、より好ましくは1～6000bp、さらに好ましくは1～4000bpである。また、例えば、置換又は挿入であれば、上流ホモロジーアーム、マーカー遺伝子群、及び下流ホモロジーアームを含み、当該マーカー遺伝子群が当該上流ホモロジーアーム及び当該下流ホモロジーアームの間に配置され、かつ当該マーカー遺伝子群と当該下流ホモロジーアームの間に当該上流ホモロジーアームの3'末端

領域をダイレクトリピートとして含むか、当該上流ホモロジーアームと当該マーカー遺伝子群の間に当該下流ホモロジーアームの5'末端領域をダイレクトリピートとして含み、さらに当該ダイレクトリピートと当該下流ホモロジーアームの間に挿入又は置換を所望する配列を含むか、当該上流ホモロジーアームと当該ダイレクトリピートの間に挿入又は置換を所望する配列を含む直鎖状DNAを用いればよい。この場合、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の標的DNA位置に所望の配列が挿入される又はレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌のゲノム上の標的DNA領域が所望の配列に置換される。挿入されるDNA領域又は置換される標的DNA領域の長さは、特に制限されないが、好ましくは1～10000bp、より好ましくは1～6000bp、さらに好ましくは1～4000bpである。

[0051] ビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作用キットは、本発明のビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法に従ってビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作を行うためのキットである。本発明のキットは、pHが6.0以上10.0未満であり、かつレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 x （質量%）が、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (\text{pH}) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ を満たす培地、並びに選択マーカー遺伝子及びupp遺伝子を含む直鎖状DNAを含有する。直鎖状DNAは、好ましくは、上流ホモロジーアーム、選択マーカー遺伝子及びupp遺伝子の2種の遺伝子、並びに下流ホモロジーアームを含み、当該2種の遺伝子は当該上流ホモロジーアーム及び当該下流ホモロジーアームの間に配置され、かつ当該2種の遺伝子と当該下流ホモロジーアームの間に当該上流ホモロジーアームの3'末端領域を含むか、当該上流ホモロジーアームと当該2種の遺伝子の間に当該下流ホモロジーアームの5'末端領域を含む。当該キットには、本発明のビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法を実施するためのガイダンス等を含んでもよい。

[0052] 後記実施例に示すように、本発明の形質転換方法により、グルコース資化能を有するビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11057 (NITE BP-02930) を親株としたUV照射及び長期継代による育種の結果、親株に比して乳培地での生残性に優れるがグルコース資化能を喪失したビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム Y 51493 (NITE ABP-03852) をレシピエントとして用い、YIT 11057のゲノムDNAをドナーとして用いて、グルコース資化能の喪失の原因であるグルコース輸送体をコードする遺伝子（配列番号14）の1塩基欠失を回復し、乳培地での優れた生残性を維持しながらグルコース資化能を有するビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 13179 (NITE ABP-03853) を取得した。YIT 13179は、2023年3月13日付で、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に寄託されている。

ここで、グルコース資化能とは、グルコースを炭素源として増殖できる能力を有していることをいう。ビフィドバクテリウム属細菌は人工的な遺伝子操作が難しい菌種であることが知られており、また、1塩基の欠失を従来のUV照射や長期継代で復元することは困難であるが、本発明の方法によれば、1塩基の欠失であっても復元可能である。

[0053] 本発明の方法により得られたビフィドバクテリウム属細菌の利用形態は特に制限されず、凍結乾燥したものであってもよく、あるいはこれら細菌を含む培養物として利用することもできるが、いずれの形態であっても、細菌が生菌の状態であることが好ましい。

[0054] 本発明の方法により得られたビフィドバクテリウム属細菌は、固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬品製剤の形態で利用することもできる。このような製剤としては、例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤等が挙げられる。これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール

、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤、賦形剤等の慣用の添加剤を適宜添加することもできる。

[0055] 本発明の方法により得られたビフィドバクテリウム属細菌は、上記のような製剤とするだけでなく、飲食品に配合して使用することもできる。飲食品に配合する場合は、そのまま、又は種々の栄養成分と共に含有せしめればよい。具体的に本発明の方法により得られたビフィドバクテリウム属細菌を飲食品に配合する場合は、飲食品として使用可能な添加剤を適宜使用し、慣用の手段を用いて食用に適した形態、すなわち、顆粒状、粒状、錠剤、カプセル、ペースト等に成形してもよく、また種々の食品、例えば、ハム、ソーセージ等の食肉加工食品、かまぼこ、ちくわ等の水産加工食品、パン、菓子、バター、粉乳に添加して使用したり、水、果汁、牛乳、清涼飲料、茶飲料等の飲料に添加して使用してもよい。なお、飲食品には、動物の飼料も含まれる。

[0056] 更に飲食品としては、本発明の方法により得られたビフィドバクテリウム属細菌を生菌の状態含有する発酵乳飲食品、発酵豆乳、発酵果汁、発酵野菜汁等の発酵飲食品が好適に用いられ、特に発酵乳飲食品の利用が好ましい。発酵乳飲食品の製造は常法に従えばよく、例えば発酵乳を製造する場合には、殺菌した乳培地に本発明の方法により得られたビフィドバクテリウム属細菌を単独又は他の微生物と同時に接種培養し、これを均質化処理して発酵乳ベースを得る。次に別途調製したシロップ溶液を添加混合し、ホモゲナイザー等で均質化し、更にフレーバーを添加して最終製品に仕上げればよい。このようにして得られる発酵乳飲食品は、シロップ（甘味料）を含有しないプレーンタイプ、ソフトタイプ、フルーツフレーバータイプ、固形状、液状等のいずれの形態の製品とすることもできる。

[0057] 斯かる発酵乳飲食品にはシロップ等の甘味料、乳化剤、増粘（安定）剤、各種ビタミン等の任意成分を配合することができる。シロップとしては、グ

ルコース、ショ糖、フルクトース、果糖ブドウ糖液糖、ブドウ糖果糖液糖、パラチノース、トレハロース、ラクトース、キシロース、ガラクトオリゴ糖(GOS)、キシロオリゴ糖(XOS)、アラビノキシロオリゴ糖(AXOS)、キシラン、アラビノキシラン、アラビノオリゴ糖(AOS)、アラビナン、麦芽糖、蜂蜜、糖蜜等の糖類、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ラクチトール、パラチニット、還元水飴、還元麦芽糖水飴等の糖アルコール、アスパルテーム、ソーマチン、スクラロース、アセスルファムK、ステビア等の高甘味度甘味料、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、レシチン等の乳化剤、寒天、ゼラチン、カラギーナン、グァーガム、キサントガム、ペクチン、ローカストビーンガム、ジェランガム、カルボキシメチルセルロース、大豆多糖類、アルギン酸プロピレングリコール等の増粘（安定）剤を配合してもよい。この他にも、ビタミンA、ビタミンB類、ビタミンC、ビタミンE類等のビタミン類、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、鉄、マンガン等のミネラル分、クエン酸、乳酸、酢酸、リンゴ酸、酒石酸、グルコン酸等の酸味料、クリーム、バター、サワークリーム等の乳脂肪、ヨーグルト系、ベリー系、オレンジ系、花梨系、シソ系、シトラス系、アップル系、ミント系、グレープ系、アプリコット系、ペア、カスタードクリーム、ピーチ、メロン、バナナ、トロピカル、ハーブ系、紅茶、コーヒー系等のフレーバー類、ハーブエキス、黒糖エキス等を配合することも可能である。

[0058] 発酵乳飲食品の製造には、本発明の方法により得られたビフィドバクテリウム属細菌以外の微生物を併用することも可能である。このような微生物としては例えば、ラクチカゼイバチルス・パラカゼイ (*Lactocaseibacillus paracasei*) 等のラクチカゼイバチルス属細菌、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*L. acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタラム (*L. plantarum*)、ラクトバチルス・ブヒネリ (*L. buchneri*)、ラクトバチルス・ガリナラム (*L. ga*

linarum)、ラクトバチルス・アミロボラス (L. amylovorus)、ラクトバチルス・ブレビス (L. brevis)、ラクトバチルス・ラムノーザス (L. rhamnosus)、ラクトバチルス・ケフィア (L. kefir)、ラクトバチルス・パラカゼイ (L. paracasei)、ラクトバチルス・クリスパタス (L. crispatus)、ラクトバチルス・ゼアエ (L. zeae)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (L. helveticus)、ラクトバチルス・サリバリウス (L. salivarius)、ラクトバチルス・ガセリ (L. gasseri)、ラクトバチルス・ファーメンタム (L. fermentum)、ラクトバチルス・ロイテリ (L. reuteri)、ラクトバチルス・デルブルッキサブスピーシーズ、ブルガリカス (L. delbrueckii subsp. bulgaricus)、ラクトバチルス・デルブルッキサブスピーシーズ、デルブルッキ (L. delbrueckii subsp. delbrueckii)、ラクトバチルス・ジョンソニー (L. johnsonii) 等のラクトバチルス属細菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) 等のストレプトコッカス属細菌、ラクトコッカス・ラクチスサブスピーシーズ、ラクチス (Lactococcus lactis subsp. lactis)、ラクトコッカス・ラクチスサブスピーシーズ、クレモリス (Lactococcus lactis subsp. cremoris) 等のラクトコッカス属細菌、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis)、エンテロコッカス・フェシウム (E. faecium) 等のエンテロコッカス属細菌、バチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) 等のバチルス属細菌、サッカロマイセス・セルビスエ (Saccharomyces cerevisiae)、トルラスポラ・デルブルッキ (Torulaspora delbrueckii)、キャンジダ・ケフィア (Candida kefir) 等のサッカロマイセス属、トルラスポラ属、キャンジダ属等に属する酵母が挙げられる。

- [0059] 本発明の方法により得られたビフィドバクテリウム属細菌を使用する場合の投与量に厳格な制限はないが、その好適な投与量は生菌数として1日当たり $10^5 \sim 10^{13}$ c f uであり、特に $10^8 \sim 10^{12}$ c f uが好ましい。

実施例

- [0060] 次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

- [0061] 実施例1 ビフィドバクテリウム属細菌におけるゲノムのモザイク化現象の発見

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する菌株を用いた難消化性多糖の資化性解析及びゲノム解析により、一部の菌株は長鎖キシラン類の資化性を示し、それは染色体中に存在するキシラナーゼ（B p X y n 1 O A）遺伝子に規定されること、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムに属する菌株のゲノム情報に基づき作成した系統樹にキシラナーゼ遺伝子保有株をプロットすると、特定のクラスターに集中するのではなく、系統樹全体に分散することが明らかになっている（非特許文献1）。よって、キシラナーゼ遺伝子は、菌株間で水平伝播することが示唆された。そこで、*i n v i t r o*でキシラナーゼ遺伝子の水平伝播について検証した。

一般的に、細菌における遺伝子水平伝播は、細胞外DNAの取り込みによる自然形質転換、ファージ感染により生じる形質導入、プラスミド等の伝播を介した接合の3様式が知られている。そこで、どの現象も検出できるように、表現型の異なるビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム2株を個別に培養後、寒天培地上で一定時間共培養して、遺伝子水平伝播の検証を行った。

- [0062] (1) 使用菌株

キシラナーゼ遺伝子を有しかつテトラサイクリン（T c）感受性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株（YIT 11025、YIT 11027、YIT 12242、YIT 12820、YIT 12824、YIT 12986）をドナー、キシラナーゼ遺伝子を有さずかつT c耐性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの

株 (YIT 4072^T、YIT 11955、YIT 11956、YIT 12228、YIT 12818、YIT 12822、YIT 12987) をレシピエントとして用いた。

[0063] (2) キシラナーゼ遺伝子の水平伝播の検証方法

ドナー及びレシピエントの各菌株を、0.5質量%グルコース・ラクトースを添加した変法GAM (mGAM) 液体培地 (日水製薬株式会社) に植菌して対数増殖期まで培養した。ドナー及びレシピエントの菌液を200 μ Lずつ混合し (菌数として約 10^{8-9} 個)、遠心分離後、200 μ Lピペットを用いて上清を除去した。チューブ内に残存する微量の培地を用いてペレットを懸濁後、全量をmGAM寒天培地 (日水製薬株式会社) 上に静置した。37℃で16~24時間、嫌気培養した後に1 μ Lループを用いて菌体をかき取り、ドナー単独又はレシピエント単独では増殖できないmPY-AX-Tc (mPY培地: 非特許文献1参照、アラビノキシラン (AX): 終濃度0.5質量%、Tc: 終濃度10 μ g/mL) 液体培地に植菌した。Eon Microplate Spectrophotometers (バイオテック社) で濁度をモニタリングした。選択培地で濁度の上昇が認められた組み合わせの一部については、新鮮な同培地に継代を行い、濁度の上昇の再現性を確認した。この菌液をTc含有 (終濃度10 μ g/mL) mGAM寒天培地に塗抹後、37℃で一晩嫌気培養し、生じたシングルコロニーを同寒天培地に継代した。翌日、菌体の一部をmPY-AX-Tc液体培地に植菌するとともに、一部をTEバッファーに懸濁して95℃で5分間加熱し、PCRの簡易鋳型とした。mPY-AX-Tc培地での増殖の有無、レシピエントがYIT 11956の場合にはレシピエント (YIT 11956) 特異的プライマー (BP28-f: GGGCAAGATCGGCATCATCTA (配列番号15)、BP28-r: CACATTGGTGGTGTTCACGTC (配列番号16)) 及びキシラナーゼ遺伝子特異的プライマー (pBpXyn10A-F: CGAGAATGCGAACACGTACTTC (配列番号17)、pBpXyn10A-R: CTGCTCGGTGTTGTAATCGTTG (配列番号18)) を用いたPCRにより、菌株識別及び同遺伝子の有無の確認を行った。キシラナーゼ遺伝子の存在が確認されたコロニーを凍結保存した。

[0064] (3) ゲノム解析方法

(2) で得られた菌体からDNAを抽出し、第2世代シーケンサーMiseq (イルミナ株式会社) 及び第3世代シーケンサーMinION (オックスフォードナノポアテクノロジーズ社) を用いてショートリード配列とロングリード配列を取得した。ハイブリッドアセンブルを行い、完全長ゲノム配列を取得した。ドナー株、レシピエント株および遺伝子獲得株のゲノム配列をsnippy (<https://github.com/tseemann/snippy>) でアライメントし、アライメント結果をfastGEAR (Mostowy et al., Molecular Biology and Evolution 34(5), 1167-1182) に入力して相同組み換え領域を同定した。また、ゲノム配列から、MUMMER (Kurtz et al., Genome Biology 5, R12, 2004) パッケージのnucmer、delta-filter及びshow-snpsを用いて一塩基多型 (SNPs) 情報を抽出し、カスタムスクリプトで出力ファイルの形式を調整後、Artemis ACT (Sanger institute) を用いて相同組み換え領域を可視化した。

[0065] (4) キシラナーゼ遺伝子水平伝播の検証結果

ドナー及びレシピエントを混合後、mGAM寒天培地で一晚嫌気培養し、mPY-AX-Tc液体選択培地に植菌して増殖性をモニタリングした結果、複数のドナーとレシピエントの組み合わせにおいて濁度の上昇が認められた。その中から、YIT 11956又はYIT 4072^Tをレシピエント、YIT 11025、YIT 11027、YIT 12820又はYIT 12824をドナーとして得られた13株の遺伝子獲得株のゲノム解析の結果、いずれの遺伝子獲得株もキシラナーゼ遺伝子を有し、ドナーではなくレシピエントと極めて近縁であることが確認され、染色体上のキシラナーゼ遺伝子が、キシラナーゼ遺伝子保有株であるドナーから同遺伝子非保有株であるレシピエントに伝播していることが明らかとなった (図1、表2)。キシラナーゼ遺伝子が伝播した株は、mPY-AX培地で増殖できることを確認した (図2)。

[0066] ゲノム配列をSNPsレベルで詳細に比較した結果、遺伝子獲得株では、

新たに獲得されたキシラナーゼ遺伝子に加えて、その上下流を含む16.5～247 kbの領域でSNPsがドナーと一致した。すなわち、遺伝子獲得株では、広範囲でダブルクロスオーバーの相同組み換えが生じたことにより、キシラナーゼ遺伝子とその上下流を含むドナー由来のゲノム領域が置換され、キシラナーゼ遺伝子が水平伝播したことがわかった。更に、ゲノム領域の置換はゲノム全体でモザイク状に生じており、置換領域も菌株により異なっていた。具体的には、1株あたりで最大7箇所、0.5～247 kbに及ぶ領域で、ドナー由来のゲノム領域が組み込まれていた(図1)。一方、置換領域にファージやプラスミドの痕跡は認められなかった。

[0067] この現象の一般性を検証するため、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムが有する他の遺伝子の水平伝播の検証も試みた。まずはスターチの資化性を規定するアミラーゼ遺伝子に注目した。アミラーゼ遺伝子を有しかつTc感受性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株(YIT 11027)をドナー、アミラーゼ遺伝子を有さずかつTc耐性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株(YIT 11956)をレシピエントとして用いた。(2)と同様の手法で、各株混合後の菌体をmPY-St-Tc(スターチ(St):終濃度0.5質量%、Tc:終濃度10 µg/mL)液体培地に植菌すると、ゲノムがモザイク化してアミラーゼ遺伝子が水平伝播した株が出現することを確認した(表2)。アミラーゼ遺伝子が伝播した株は、mPY-Starch培地で増殖できることを確認した(図3)。さらに、Tc耐性遺伝子にも着目した。Tc耐性遺伝子を有しかつエリスロマイシン(Em)感受性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株(YIT 4072^T、YIT 11955、YIT 12987)をドナー、Tc耐性遺伝子を有さずEm耐性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの株(YIT 12824)をレシピエントとして用いた。(2)と同様の手法で、各株混合後の菌体をEm(終濃度1 µg/mL)-Tc(終濃度10 µg/mL)を添加した0.5質量%ラクトース添加変法GAM(mGAML)(EmTc-mGAML)寒天培地に塗抹すると、ゲノムがモザイク化してTc耐性遺伝子が水平

伝播した株が出現することを確認した（表2）。Tc耐性遺伝子が伝播した株は、Tc-mGAML培地で増殖できることを確認した（図4）。

[0068] [表2]

ドナー株	レシピエント株	獲得表現型
LCX ⁺ Tc ^S	LCX ⁺ Tc ^R	
YIT 11025	YIT 11956	LCX ⁺ Tc ^R
YIT 11027	YIT 11956	LCX ⁺ Tc ^R
YIT 12820	YIT 11956	LCX ⁺ Tc ^R
YIT 12824	YIT 11956	LCX ⁺ Tc ^R
YIT 12824	YIT 4072 ^T	LCX ⁺ Tc ^R
ST ⁺ Tc ^S	ST ⁺ Tc ^R	
YIT 11027	YIT 11956	ST ⁺ Tc ^R
Em ^S Tc ^R	Em ^R Tc ^S	
YIT 11955	YIT 12824	Em ^R Tc ^R
YIT 12987	YIT 12824	Em ^R Tc ^R
YIT 4072 ^T	YIT 12824	Em ^R Tc ^R

* LCX⁺/−: BpXyn10A遺伝子を持ち長鎖キシラン類(LCX)の資化性あり/なし

* Tc^{S/R}: テトラサイクリン感受性/耐性

* ST⁺/−: スターチ資化性あり/なし

* Em^{S/R}: エリスロマイシン感受性/耐性

[0069] 実施例2 ビフィドバクテリウム属細菌における自然形質転換の検証

ビフィドバクテリウム属細菌のゲノムのモザイク化では、ファージやプラスミドの水平伝播の痕跡が認められなかったことから、自然形質転換によるものかを検証した。

[0070] (1) 使用菌株

Tc耐性かつEm感受性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの基準株であるYIT 4072^Tをドナーとして、Tc感受性かつEm耐性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 12824をレシピエントとして用いた。

[0071] (2) ドナーとして用いるゲノムDNAの抽出及びPCR産物の調製方法

YIT 4072^TをmGAML液体培地で一晩培養し、NucleoBond Buffer Set III及びNucleoBond AXG20カラム

(タカラバイオ株式会社)を用いて高分子ゲノムDNAを精製した。P i c o g r e e n k i tを用いて二本鎖DNA量を定量し、30ng／μLとなるようにTE b u f f e rで希釈した。また、このゲノムDNAを鋳型として、T c耐性遺伝子 (t e t W) を含む約20k bの領域をP C Rで増幅した。P C R酵素には高正確性酵素P r i m e S T A R G X L DNA p o l y m e r a s e (タカラバイオ株式会社)を用いた。酵素を0.2 μL、50 μMプライマー (配列番号19及び20)をそれぞれ0.04 μL、鋳型DNA (0.02ng／μL)を1 μL、d N T P溶液を1.6 μL、5×b u f f e rを4 μL混合し、P C Rチューブ1本あたりの反応液量を20 μLとした。得られたP C R産物はエタノール沈殿後、T E b u f f e rに溶解した。P i c o g r e e nを用いて二本鎖DNAを定量後、1ng／μLとなるようにT E b u f f e rで希釈し、小分けにして凍結保存した。

本実施例で使用したプライマー及びP C R条件を表3に示す。

[0072] [表3]

プライマー名	配列 (5'-3')	配列 番号	増幅産物長 (bp)	PCR 条件
BpTy20k-F	TCC TGTGGATTTCGACGGTGACGAGCAG	19	19645	1
BpTy20k-R	GAGTGC GGTT GATGGTGCATACGGCAAG	20		
PCR 条件 1. 98℃ 20sec, (98℃ 10sec, 68℃ 10min)×30, 4℃ ∞				

[0073] (3) 死菌体の調製方法

YIT 4072^Tを2 mLのm G A M L液体培地にて対数増殖期後期まで培養し、m P Y液体培地で洗浄後、ペレットを180 μLの同培地に懸濁した。20 μLを1.5 mLスクリーキャップチューブに分取し、ヒートブロックを用いて80℃で10分間加熱し、死菌体を調製した。この処理により菌体が完全に死滅することを別途確認した。

[0074] (4) 生菌体、加熱死菌体及び精製DNAをドナーとした抗生物質耐性遺伝子の水平伝播の検証

YIT 4072^T及びYIT 12824の各菌株の凍結菌体をmGAML寒天培地に植菌して37℃で嫌気培養後、得られた菌体を同液体培地400μLに継代した。3～4時間培養後、同液体培地を1600μL追加して対数増殖期後期から定常期に到達するまで4～5時間培養した。各菌液を集菌し、mPY液体培地で洗浄後、再度集菌して同培地180μLに懸濁した。レシピエント(YIT 12824)の菌液5μLと、ドナー(YIT 4072^T)の生菌液、(3)で調製した死菌液又は(2)で調製した精製DNAを5μL混合し(菌数としてそれぞれ約10⁷⁻⁸個)、全量をmGAM寒天培地に静置した。37℃で16～24時間嫌気培養後に菌体を1μLループを用いて全量掻き取り、mPY液体培地60μLに懸濁後、段階希釈してEmTc-mGAML寒天培地に塗抹し、37℃で2～3日間、嫌気培養してコロニー数をカウントした。一部のコロニーについては、実施例1(3)と同様にしてゲノム解析を行い、相同組み換えが生じたことを確認した。

[0075] (5) DNA分解酵素(DNase I)の添加による影響の検証

(4)と同様にYIT 4072^T及びYIT 12824の洗浄済み生菌液を調製した。洗浄済み菌液を各株20μLずつ1.5mLチューブに分取して混合し、遠心後、ペレットを40μLの1×DNase I buffer(タカラバイオ株式会社)に懸濁した。そこに原液(5U/μL)、又は1×DNase I bufferで1/10(0.5U/μL)もしくは3/10(1.5U/μL)に希釈したRecombinant DNase I(タカラバイオ株式会社)を8μLずつ添加した。mGAM寒天培地に12μLずつ、1条件あたり3点静置した。菌体を静置した寒天培地を37℃で16時間嫌気培養後、菌体を1μLループで全量掻き取り、mPY液体培地60μLに懸濁後、同培地を用いて適宜希釈した。Tc耐性遺伝子が水平伝播した菌数を測定するためEmTc-mGAML寒天培地に菌液を塗抹した。また、Em耐性株の総生菌数を検出するため、Em-mGAML寒天培地にも菌液を塗抹した。各寒天培地を37℃で2～3日間、嫌気培養し、Em耐性株の総生菌数に占めるモザイク化菌数の比率をモザイク化の頻度(Frequency)

c y) とした。

[0076] (6) 結果

ドナーのYIT 4072^T (T c 耐性株) の生菌体及びレシピエントのYIT 12824 (E m 耐性株) を混合後、m G A M 寒天培地で一晚嫌気培養し、ドナー単独又はレシピエント単独では増殖できない選択培地で両耐性株が出現するか検討したところ、両抗生物質に耐性を示すコロニーが出現した。得られた6株のゲノム解析の結果、T c 耐性遺伝子及びその近傍領域を含む複数領域でモザイク状の相同組み換えが生じていることを確認した。組み換え領域数は1～4であり、最大組み換え領域長は22～112 kbであった。

ドナーとして死菌体を用いた場合、ドナーとして生菌体を用いるよりは頻度が下がるものの、T c 耐性遺伝子が水平伝播することを確認した(図5 A)。同様に、ドナーをゲノムDNA又はPCR産物に置き換えても水平伝播は生じた(図5 B)。ドナーとして死菌体を用いた場合、ゲノム解析した2株において、組み換え領域数は1～2、最大組み換え領域長は16～45 kbであり、ドナーとしてゲノムDNAを用いた場合、ゲノム解析した2株において、組み換え領域数は1、最大組み換え領域長は12～16 kbであり、ドナーとしてYIT 4072^TのゲノムDNAを鋳型として調製したPCR産物を用いた場合、ゲノム解析した1株において、組み換え領域数は1、最大組み換え領域長は12 kbであった。更に、ドナーとして生菌体を用いた試験系にDNA分解酵素を添加した結果、遺伝子水平伝播は阻害された(図5 C)。したがって、ビフィドバクテリウム属細菌における遺伝子水平伝播を伴うゲノムのモザイク化の経路は、細胞外DNAの取り込み及び相同組み換えによる自然形質転換であることが明らかとなった。よって、上記のモザイク化の頻度(Frequency)とは、形質転換頻度を意味する。

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムにおける自然形質転換の普遍性を確認した結果、YIT 4072^TのゲノムDNAを鋳型として調製したPCR産物をドナーとして、あらたに11株でT c 耐性遺伝子が水平伝播することを確認した(表4)。

[0077] [表4]

ドナー株	レシピエント株	獲得表現型
Tc ^R	Tc ^S	
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12989	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 11952	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 11953	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12145	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12203	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12232	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12817	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12819	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12820	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12821	Tc ^R
YIT 4072 ^T (PCR産物)	YIT 12985	Tc ^R

* Tc^{S/R}: テトラサイクリン感受性/耐性

[0078] 実施例3 ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換頻度に影響を与える因子の探索

細菌における自然形質転換による外来DNAの取り込みは、ゲノムの多様性を増し、細菌の環境適応に寄与すると考えられている。一方で、過度な自然形質転換は、長い時間をかけて進化させてきたゲノム構造を攪乱させ、むしろ細菌にデメリットを与える可能性がある。そのため、自然形質転換が報告されている多くの菌種では、自然形質転換は厳密な制御下に置かれ、特定の環境条件でしか発動しない。そこで、ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換を効率よく行うため、自然形質転換が発動する条件の検討を行った。

[0079] (1) 使用菌株

Tc感受性のビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 12819 (GenBankアクセッション番号：GCA_020526245.1) をレシピエントとして用いた。

[0080] (2) ドナーDNAの調製

まずは染色体の遺伝子間領域にTc耐性遺伝子を挿入したYIT 12819を作出

した。当該株のゲノムDNAを鋳型としたPCRにより、Tc耐性遺伝子とその上下流に約10kbのホモロジーアームを含む約20kbのドナーDNAを増幅した。

[0081] (i) Tc耐性遺伝子挿入株の作出

YIT 4072^TのTc耐性遺伝子(tetW)をYIT 12819の遺伝子間領域に挿入するためのコンストラクトをPCRにより調製した。全てのPCRには高正確性DNA polymeraseであるKOD-Plus-Neo(東洋紡株式会社)を用い、プライマーの終濃度は0.3 μMとした。挿入用コンストラクトの上流相同領域(上流ホモロジーアーム)は、YIT 12819のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号21及び22のプライマーを用いたPCRにより増幅し、挿入用コンストラクトの下流相同領域(下流ホモロジーアーム)は、YIT 12819のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号25及び26のプライマーを用いたPCRにより増幅した。Tc耐性遺伝子領域については、YIT 4072^TのゲノムDNAを鋳型とし、配列番号23及び24のプライマーを用いたPCRにより増幅した。アガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドを切り出した後、Freeze'N'Squeezeスピンカラム(BIO-RAD)を用いてゲルからDNAを抽出した。アガロースゲル電気泳動により各断片の濃度差を目視で確認し、概ね等濃度となるようにこれらを混合し、配列番号21及び26のプライマーを用いて、オーバーラップエクステンションPCR(OE-PCR)により連結した。電気泳動により目的の増幅産物が得られたことを確認した後、ゲルから目的のバンドを抽出してエタノール沈殿を行い、得られたDNAをTE bufferに溶解した。このDNA溶液とYIT 12819(菌数として約10⁷個)を混合し、50 mM塩化マグネシウム添加mGAM寒天培地上に菌液を静置して37℃で16時間嫌気培養して形質転換を行い、翌日に菌体をTc(終濃度10 μg/mL)含有mGAM寒天培地に塗抹し、Tc耐性遺伝子挿入株を得た。

[0082] (ii) PCR断片の作製

Tc耐性遺伝子が挿入されたYIT 12819のゲノムDNAを鋳型として、Tc

耐性遺伝子を含む約20 kbのPCR断片を調製した。PCR酵素にはPrimeSTAR GXL DNA polymeraseを用いた。断片の増幅には、配列番号27及び28のプライマーを用いた。電気泳動により目的の増幅産物が得られたことを確認し、エタノール沈殿を行った。Picogreenで二本鎖DNA濃度を定量した後、TEバッファーを用いて1 ng/μLに調製し、小分けにして分注し-30℃で凍結保存した。

本実施例で使用したプライマー及びPCR条件を表5に示す。

[0083] [表5]

プライマー名	配列 (5'-3') ^a	配列番号	増幅産物長 (bp)	PCR条件
In-up-f	AAGTGTGGTTTGTGCGTTCCG	21	1016	1
In-up-r	<u>TAGATGTGCCGAAATCGGGACTTGGTACTTTTCGG</u>	22		
In-tet-f	<u>TACCAAGTCCCGATTTCGGCACATCTAAACCAAGG</u>	23	2558	2
In-tet-r	<u>TAGATGTGCCGAAACCAGTGAATGCCCTCCTGATT</u>	24		
In-down-f	<u>GGGCATTCACTGGTTTCGGCACATCTAAACCAAGG</u>	25	1886	1
In-down-r	CGCAAGTGTGTGCTTCTGT	26		
In-up-f	AAGTGTGGTTTGTGCGTTCCG	21	5462	3
In-down-r	CGCAAGTGTGTGCTTCTGT	26		
20k-f	TGGCGGTGCTTCCGGGTTCGGTGATTCCCTTGTT	27	19900	4
20k-r	CACGGGCGACGGGCTGTCTACCAACTCCACGAC	28		

a: 下線はオーバーラップ領域

PCR 条件

1. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 68℃ 75sec)×30, 4℃ ∞

2. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 65℃ 30sec, 68℃ 90sec)×30, 4℃ ∞

3. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 68℃ 3min)×30, 4℃ ∞

4. 98℃ 20sec, (98℃ 10sec, 68℃ 10min)×30, 4℃ ∞

[0084] (3) 形質転換の方法

YIT 12819の凍結菌体をmGAML寒天培地に植菌して37℃でグローブボックス内で嫌気培養後、得られた菌体をmGAML液体培地400 μLに継代した。3～4時間培養後、同液体培地を1600 μL追加して対数増殖期後期から定常期に到達するまで3～4時間培養した。菌液から菌体を集菌し、mPY液体培地で洗浄後、再度集菌して同培地180～220 μLに懸濁し、形質転換用の菌液とした。当該菌液（菌数として約10⁷⁻⁸個）と(2)のドナーDNAを等容量混合し、以下に示す各種寒天培地に10 μLずつ5箇

所静置した（ $N=5$ ）。 37°C で16時間嫌気培養後、静置していた菌体を $1\mu\text{L}$ ループで全量掻き取り、mPY液体培地 $60\mu\text{L}$ に懸濁した。同培地を用いて適宜希釈し、Tc含有mGAML寒天培地に塗抹して形質転換体のCFUを、Tcを添加していないmGAML寒天培地に塗抹して総CFUを測定した。総CFUに対する形質転換体のCFUの比率を形質転換の頻度とした。

[0085] (4) 使用培地

(i) pH変更培地

mGAM液体培地を調製し、pHを測定した（未調整時の実測値はpH7.0）。塩酸又は水酸化ナトリウムを添加してpHを5.5から8.5まで0.5間隔に調整後、Bacto Agar（終濃度1.5%）を添加してオートクレーブ滅菌し、シャーレに分注し、安全キャビネット内で1～1.5時間乾燥させた。

(ii) 各種塩及び糖の添加培地

mGAM寒天培地（pH7.0）に塩化ナトリウム（50、100、200mM）、塩化カリウム（50mM）、塩化アンモニウム（50mM）、塩化マグネシウム（5、20、50、100、200mM）、又はラクトース（2.5、5.0、50mM、それぞれ、約0.086、0.17、1.71質量%に相当）（全て終濃度）を添加してオートクレーブ滅菌し、シャーレに分注し、安全キャビネット内で1～1.5時間乾燥させた。なお、mGAM培地には、もともとグルコース0.05質量%が含まれているので、上記培地の易分解糖含有量は、グルコースとラクトースの合計含有量であり、それぞれ、約0.136、0.22、1.76質量%となる。また、mGAM寒天培地には、溶性でんぷん0.5質量%も含まれているが、本実験に用いたYIT 12819は溶性でんぷんの資化性を示さないことから、本実験では溶性でんぷんを易分解性糖とはみなさない。

(iii) pH変更かつ糖添加培地

mGAM液体培地を調製し、水酸化ナトリウムを添加してpHを7から1

0まで1間隔に調整後、ラクトース（終濃度0、0.25、0.50、0.75、1.00質量%）及びBacto Agar（終濃度1.5%）を添加してオートクレーブ滅菌し、シャーレに分注し、安全キャビネット内で1～1.5時間乾燥させた。

（iv）浸透圧調整培地

変法トリプチケースソイ寒天培地（トリプチケース1.5質量%、大豆プトン0.05質量%、Bacto Agar 1.5質量%）（pH 7.0）に、塩化ナトリウム（終濃度で0、25、50、75、100、125、150、200 mM、それぞれの浸透圧の実測値は、65、102、134、211、417、593、681、761 mOsm）を添加してオートクレーブ滅菌し、シャーレに分注し、安全キャビネット内で1～1.5時間乾燥させた。

（v）市販培地

変法GAM寒天培地（日水製薬）、MRS寒天培地（BD Difco）、TOSプロピオン酸寒天培地（ヤクルト薬品工業）、トリプチケースソイ寒天培地（BD BBL）、クックドミート寒天培地（OXOID）（終濃度1.5% Bacto Agar 添加）を調製した。

[0086] （5）結果

mGAM寒天培地のpHを変化させて形質転換を行った結果、培地のpHが形質転換頻度に影響することがわかった（図6A）。pH 6.0から8.5で形質転換が生じ、形質転換頻度はpH 6.5で最大となった一方で、pH 6.0では著しく低下した。このことから、酸性環境は形質転換を阻害することがわかった。また、ビフィズス菌が容易に分解できる糖（ラクトース）は添加量依存的に形質転換を抑制した（図6B）。糖による形質転換抑制は、糖代謝により生じる酸が菌体周囲のpHを低下させるためと考えられた。このことから、アルカリ性の培地では、糖添加による形質転換抑制作用が軽減されることが予想された。検証の結果、培地をアルカリ性にすることで、より多量の糖の存在下でも形質転換が生じることを確認した（図6C）。

検証結果を総合すると、形質転換が生じる培地のpHと糖添加量の関係性は以下の数式で表されることがわかった（図6C）。

pHが6.0以上10.0未満で、糖類の含有量 x （質量%）が
pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ 、
pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (\text{pH}) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ 。

さらに、各種の塩も形質転換頻度に影響することがわかった（図6D）。適度な濃度の塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、又は塩化マグネシウムは形質転換を促進した。塩化マグネシウムについては、添加量5～100mMでよく促進された（図6E）。塩化マグネシウム以外の塩では、添加量が等しいと自然形質転換の頻度もほぼ同値となったことから、培地の浸透圧が影響することが予想された。これを検証するため、塩化ナトリウムで浸透圧を調整した培地を用いて自然形質転換の頻度を測定した結果、134～681mOsmの培地で自然形質転換が生じたが、102mOsm以下及び761mOsmの培地では自然形質転換は生じなかった（図6F）。また、417mOsm付近で形質転換頻度がピークに達した。したがって、浸透圧が形質転換に影響を与えることがわかった。

次に、培地のゲル化剤の影響を検証した。mGAM寒天培地及びmGAM液体培地（静置培養及び10rpmで回転振盪培養）で自然形質転換頻度を測定した結果、この3条件では寒天培地で最も効率よく自然形質転換が生じた一方、回転振盪培養した液体培地では自然形質転換はほとんど生じなかった（図6G）。

最後に、市販の培地を用いて自然形質転換が生じるかどうか検証した（図6H）。mGAM寒天培地の他にもクックドミート培地（CM）及びトリプチケースソイ寒天培地（TS）でも自然形質転換が生じたことを確認した。いずれも浸透圧、pH及び易分解性糖の含有量は上記の範囲内であった。一方、ビフィズス菌の培養に常用されているTOSプロピオン酸寒天培地（ガラクトオリゴ糖1質量%含有）及びMRS寒天培地（デキストロース2質量

%含有)では自然形質転換は生じなかった。いずれも易分解性糖が多量に含まれていることから、酸産生によるpH低下により形質転換が抑制されたと考えられた。

本検討において、形質転換頻度はmGAM寒天培地に塩化マグネシウムを50mM添加した際に最大となり、この際の形質転換体取得効率はドナーDNAの1 μ gあたり 2.5×10^8 個であった。この数値は、プラスミドを用いたビフィズス菌の形質転換体取得効率として報告されている最大値(3.8×10^6 個/ μ g DNA: 非特許文献4)よりも65.7倍高かった。

[0087] 実施例4 ビフィドバクテリウム属細菌のマーカースレスゲノム操作系の確立

実施例3(2)(i)より、ビフィドバクテリウム・シュードカタヌラータムをレシピエント、直鎖状DNAをドナーとして用い、レシピエントのゲノム上の任意の位置に薬剤耐性遺伝子を挿入することが可能であることがわかった。したがって、同様の操作により、任意の標的遺伝子を直鎖状DNAに含まれる薬剤耐性(マーカース)遺伝子等に置換して標的遺伝子を破壊することが可能であることが期待された。一方でマーカース遺伝子の置換による遺伝子破壊法では、多重破壊が困難である。よって、ゲノム中にマーカース遺伝子の痕跡を残さずに標的領域を自由に編集可能なマーカースレスゲノム操作系の確立が望まれる。

一般的なマーカースレスゲノム操作系は、ポジティブセレクションマーカースを用いたコンストラクトの導入(ポジティブセレクション)と、ネガティブセレクションマーカースを用いた不要配列の除去(ネガティブセレクション)による2段階で構成される。実施例2及び3に示すように、本発明の形質転換方法によるポジティブセレクションは可能であることから、ネガティブセレクションマーカースの探索と、マーカースレスゲノム操作系についての検討を行った。

[0088] (1) 使用菌株

Tc感受性のビフィドバクテリウム・シュードカタヌラータム YIT 12819 をレシピエントとして用いた。

[0089] (2) 5-フルオロウラシル感受性の確認

嫌気グローブボックス内でYIT 12819をmGAML液体培地にて対数増殖期後期まで培養後、培養液の原液及び10倍希釈液50 μ Lを5-フルオロウラシル(5FU)添加(終濃度100 μ g/mL)mGAML寒天培地に塗抹して嫌気培養した。また、同培養液を適宜希釈し、mGAML寒天培地に塗抹して培養液中の総菌数を測定した。総菌数に占める5FU耐性菌数を5FU耐性コロニー出現率とした。

[0090] (3) upp欠失用コンストラクトの調製

YIT 12819のuracil phosphoribosyl transferase (UPRTase) をコードするupp遺伝子の上下流領域をOE-PCRにより連結し、upp欠失用コンストラクトを調製した。PCR酵素には、KOD-Plus-Neoを用いた。上流領域はYIT 12819のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号29及び30のプライマーを用いたPCRにより増幅した。下流領域はYIT 12819のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号31及び32のプライマーを用いたPCRにより増幅した。各断片をアガロースゲル電気泳動後のゲルから抽出し、概ね等濃度となるように混合したものを鋳型とし、配列番号29及び32のプライマーを用いてOE-PCRを行った。アガロースゲル電気泳動後、ゲルから目的のバンドを抽出した。最終的にエタノール沈殿を行い、DNAをTEバッファーに溶解して以下の試験に用いた。当該DNAは、5'側から、upp遺伝子の上流領域に相同な塩基配列からなる上流ホモロジーアーム及びupp遺伝子の下流領域に相同な塩基配列からなる下流ホモロジーアームを含む。

本実施例で使用したプライマー及びPCR条件を表6に示す。

[0091]

[表6]

プライマー名	配列 (5'-3') ^a	配列番号	増幅産物長 (bp)	PCR条件
upp-up-f	GCGTTCCTGAATGGGAAGTA	29	3389	1
upp-up-OE-r	<u>TTTCCTCGCGATTATGGCCGCATCAGAGCTCAACC</u>	30		
upp-down-OE-f	<u>TGAGCTCTGATGCGGCCATAATCGCGAGGAAAAGC</u>	31	3498	1
upp-down-r	TGAAGTACCGTTCGTTCGTG	32		
upp-up-f	GCGTTCCTGAATGGGAAGTA	29	5665	2
upp-down-r	TGAAGTACCGTTCGTTCGTG	32		

a: 下線はオーバーラップ領域

PCR 条件
1. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 68℃ 2min)×30, 4℃ ∞
2. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 65℃ 30sec, 68℃ 4min)×30, 4℃ ∞

[0092] (4) upp欠失株の作出

YIT 12819の凍結菌体をmGAML寒天培地に植菌して嫌気培養後、得られたコロニーを同液体培地400μLに継代した。3～4時間培養後、同液体培地を1600μL追加して対数増殖期後期まで4～5時間培養した。遠心分離後、菌体ペレットを1mLのmPY液体培地で1回洗浄し、ペレットを同液体培地200μLに懸濁した。菌液と等容量の(3)のupp欠失用コンストラクトDNA溶液を混合し(各5μL、菌数として約10⁷⁻⁸個)、10μLピペットで混合液10μLを静かに50mM塩化マグネシウム添加mGAML寒天培地上にスポットして、液体が乾燥するまで数分間静置後、37℃で16時間嫌気培養した。翌日、菌体を1μLループで全量掻き取り、mPY液体培地60μLに懸濁後、5FU添加(終濃度100μg/mL)mGAML寒天培地に塗抹して37℃で培養した。翌日、得られたコロニーを同寒天培地に継代後、一部をTEバッファーに懸濁して95℃で5分間加熱し、PCRの鋳型とした。uppの有無を確認するため、upp遺伝子検出用プライマー(139q-f: CGATCATTGTGCCTGTGCTG(配列番号33)、139q-r: TGA TCTGCTGGGTTGGGTTTC(配列番号34))とABI7500を用いたリアルタイムPCRを実施した。upp遺伝子が検出されなかった株については、欠失

部位確認用プライマー（upp-del-check-f: GACAATTCCAAGTGGGGTTC（配列番号 35）、upp-del-check-r: GTCGCGGAAACTGGAGTAA（配列番号 36））を用いたPCRを行った。アガロースゲル電気泳動によりPCR産物の断片長を確認し、欠失株で予想されたサイズの断片（879bp）が得られることを確認した。更に、このPCR産物を鋳型としてサンガー法によるシーケンスを行い、意図しない塩基配列の変異がないことを確認し、upp欠失株（YIT 12819 Δupp）を得た。

[0093] (5) upp-tetWカセットの調製

YIT 12819のupp遺伝子の下流の遺伝子間領域にTc耐性遺伝子（tetW）を挿入するためのコンストラクトを調製した。PCR酵素には、KOD-Plus-Neoを用いた。上流ホモロジーアームはYIT 12819のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号37及び38のプライマーを用いたPCRにより増幅した。下流ホモロジーアームはYIT 12819のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号41及び42のプライマーを用いたPCRにより増幅した。Tc耐性遺伝子領域については、YIT 4072^TのゲノムDNAを鋳型とし、配列番号39及び40のプライマーを用いたPCRにより増幅した。各断片をアガロースゲル電気泳動後のゲルから抽出し、概ね等濃度となるように混合したものを鋳型として、配列番号37及び42のプライマーを用いて、OE-PCRを行った。アガロースゲル電気泳動後、ゲルから目的のバンドを抽出した。最終的にエタノール沈殿を行い、DNAをTEバッファーに溶解した。当該DNAは、5'側から、upp遺伝子の直下の上流領域に相同な塩基配列からなる上流ホモロジーアーム、upp遺伝子、tetW遺伝子、及びupp遺伝子の直下の下流領域に相同な塩基配列からなる下流ホモロジーアームを含む。

YIT 12819と当該コンストラクトを用いた以外は(4)と同様にして形質転換を行い、菌体をTc添加（終濃度10μg/mL）mGAML寒天培地に塗抹し、Tc耐性コロニーを単離した。コロニーのゲノムDNAを鋳型として、upp遺伝子の推定プロモーター配列及びtetW遺伝子の推定ターミ

ネーター配列を含む領域を配列番号 4 3 及び 4 4 のプライマーを用いて P C R で増幅し、u p p - t e t Wカセットを調製した。

本実施例で利用したプライマー及び P C R 条件を表 7 に示す。

[0094] [表7]

プライマー名	配列 (5'-3') ^a	配列 番号	増幅産物長 (bp)	PCR 条件
upp-tet-up-f	TCATGCACCTGAACCGACT	37	1850	1
upp-tet-up-OE-r	TTAGATGTGCCGAAAAGAAACGAGCCAACCGTACCT	38		
tet-OE-f	TTTCGGCACATCTAAACCAAGG	39	2558	1
tet-OE-r	CCAGTGAATGCCCTCCTGATT	40		
upp-tet-down-OE-f	GAGGGCATTCACITGGCACAGTGGGATGACTGGTTC	41	1257	1
upp-tet-down-r	GTACGAAATCGTCCCGTTTG	42		
upp-tet-up-f	TCATGCACCTGAACCGACT	37	5665	2
upp-tet-down-r	GTACGAAATCGTCCCGTTTG	42		
upp-te-cassette-f	GCTTGCCGAACTTTGTCTAT	43	3553	3
upp-te-cassette-r	TCTGCACCCACCTCTGTACC	44		

a: 下線はオーバーラップ領域

PCR 条件
1. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 65℃ 30sec, 68℃ 90sec)×30, 4℃ ∞
2. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 65℃ 30sec, 68℃ 4min)×30, 4℃ ∞
3. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 68℃ 2min)×30, 4℃ ∞

[0095] (6) 標的遺伝子欠失用コンストラクトの調製

YIT 12819のYIT 12819_00675～677遺伝子を標的遺伝子とした。YIT 12819 のゲノムにおける当該遺伝子の上下流領域と (5) の u p p - t e t Wカセ ットを O E - P C R により連結し、標的遺伝子欠失用コンストラクトを調製 した。P C R 酵素には、K O D - P l u s - N e oを用いた。上流領域はYIT 12819のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号 4 5 及び 4 6 のプライマーを用 いた P C R により増幅した。下流領域はYIT 12819のゲノムDNAを鋳型とし 、配列番号 4 7 及び 4 8 のプライマーを用いた P C R により増幅した。この 際、下流領域の u p p - t e t Wカセットと隣接する領域の塩基配列を、上 流領域と当該カセットの隣接部にダイレクトリピートとして挿入した。各断 片をアガロースゲル電気泳動後のゲルから抽出した。下流領域及び u p p - t e t Wカセットの断片を概ね等濃度となるように混合したものを鋳型とし

て、配列番号 4 5 及び 4 4 のプライマーを用いて O E − P C R を行った。アガロースゲル電気泳動後、ゲルから目的のバンドを抽出して得た断片と上流領域の断片を概ね等濃度となるように混合したものを鋳型として、配列番号 4 5 及び 4 8 のプライマーを用いて O E − P C R を行った。アガロースゲル電気泳動後、ゲルから目的のバンドを抽出した。最終的にエタノール沈殿を行い、D N A を T E バッファーに溶解して以下の試験に用いた。当該 D N A は、5′ 側から、標的遺伝子上流領域に相同な塩基配列からなる上流ホモロジーアーム（3′ 末端領域にダイレクトリピートを含む）、u p p 遺伝子、t e t W 遺伝子、ダイレクトリピート、及び標的遺伝子下流領域に相同な塩基配列からなる下流ホモロジーアームを含む。

本実施例で使用したプライマー及び P C R 条件を表 8 に示す。

[0096] [表8]

プライマー名	配列 (5'-3') ^a	配列番号	増幅産物長 (bp)	PCR 条件
com-up-f	ATAATGGAACGGCTCACCAC	45	1050	1
com-up-r	CAAAAGTTTCGGCAAGCAAGCCTGCACAGATCAACG	46		
com-down-f	AGAGGTGGGTGCAGACCGTGGTTATGCGTGTCGTGAT	47	1844	2
	GCGTATGTTTTCGATGGATTCCGTTGATCTGTGCAG			
com-down-r	GCTTGATTCAAGTCCAGCAGAAAGGA	48	4603	3
com-down-r	GAGACGAAGGTGGTGGTGAT	48		
com-up-f	ATAATGGAACGGCTCACCAC	45		
com-up-f	ATAATGGAACGGCTCACCAC	45		
upp-te-cassette-r	TCTGCACCCACCTCTGTACC	44	6447	3
com-up-f	ATAATGGAACGGCTCACCAC	45		
com-down-r	GAGACGAAGGTGGTGGTGAT	48		

a: 一重線はオーバーラップ領域、二重線はダイレクトリピート

PCR 条件
1. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 68℃ 2min)×30, 4℃ ∞
2. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 65℃ 30sec, 68℃ 90sec)×30, 4℃ ∞
3. 94℃ 2min, (98℃ 10sec, 65℃ 30sec, 68℃ 4min)×30, 4℃ ∞

[0097] （7）標的遺伝子欠失株の作出

YIT 12819 Δuppと（6）の標的遺伝子欠失用コンストラクトを用いた以外は（4）と同様にして形質転換を行い、菌体を T c 添加 m G A M L 寒天培地に塗抹後、得られたコロニーを T c 添加 m G A M L 寒天培地及び 5 F U 添加

m G A M L 寒天培地にレプリカ継代した。T c 耐性かつ 5 F U 感受性コロニーを複数選抜し、菌体を T E バッファーに懸濁して 9 5 °C で 5 分間加熱し、P C R の鋳型とした。u p p 遺伝子検出用プライマー（配列番号 3 3 及び 3 4）、t e t W 遺伝子検出用プライマー（tetW-f: TCGCTGTCCCGGAAATAGTC（配列番号 4 9）、tetW-r: CTGTCACCGCATCCATCAACG（配列番号 5 0））、YIT 12189_00675 検出用プライマー（675q-f: CATCCTGGCCGAAAGCAATC（配列番号 5 1））、675q-r: GGTGATGTTGCCATGCTGTG（配列番号 5 2））、YIT 12189_00676 検出用プライマー（676q-f: CGCATGACTGCTTGAACGAC（配列番号 5 3））、676q-r: CTTGCATACGCCTTGATCGC（配列番号 5 4））、YIT 12189_00677 検出用プライマー（677q-f: CGCATGGCTGGAAGACAAG（配列番号 5 5））、677q-r: CGCCTGGTTTGACTTCGAC（配列番号 5 6））を用いたリアルタイム P C R により、u p p 遺伝子、t e t W 遺伝子、及び標的遺伝子の有無を確認し、t e t W 遺伝子及び u p p 遺伝子が挿入され、かつ標的遺伝子が欠失した株を選抜した。各コロニーを m G A M L 液体培地に植菌し、対数増殖期後期まで培養後、菌液 5 0 μ L を 5 F U 添加 m G A M L 寒天培地に塗抹した。翌日に得られたコロニーを T c 添加 m G A M L 寒天培地及び 5 F U 添加 m G A M L 寒天培地にレプリカ継代し、T c 感受性かつ 5 F U 耐性コロニーを選抜した。菌体を T E バッファーに懸濁して 9 5 °C で 5 分間加熱し、これを鋳型として P C R を行い、u p p 遺伝子、t e t W 遺伝子、及び標的遺伝子の有無を確認した。全遺伝子が検出されなかった株については、サンガー法により組み換え部位の塩基配列を決定した。

[0098] (8) 結果

枯草菌等でネガティブセレクションマーカーとして機能することが報告されている 5 F U) / u p p 系 (Fabret et al., Mol. Microbiol. 46(1)25-36, 2002) に着目した。この系は、u p p 遺伝子がコードする U P R T a s e がウラシルの類似物質である 5 F U を 5 - f l u o r o u r i d i n e m o n o p h o s p h a t e に変換する性質を応用したものであり、最終的には毒性の代謝産物 (5 - f l u o r o - d U M P) が生じて菌体が死滅する

。すなわち、u p p 遺伝子を有さない株は、5 F U 存在下で死滅しない一方で、外来性 u p p 遺伝子が致死性のネガティブセレクションマーカーとして機能することが期待される。

5 F U / u p p 系が機能するためには、u p p 遺伝子を有する菌体が 5 F U 添加培地で致死性を示すことが前提となる。ゲノム解析により、YIT 12819 には u p p 遺伝子が存在することを確認した。続いて、5 F U 添加寒天培地に YIT 12819 の培養液を菌数として 1.6×10^8 又は 1.6×10^7 C F U 塗抹した結果、5 F U 耐性菌数は 10^5 又は 8×10^4 C F U と少なく、大部分の菌は死滅した。5 F U 耐性コロニー出現頻度は、 6.5×10^{-7} 又は 4.9×10^{-7} と低く、5 F U / u p p 系が機能する枯草菌よりも低値であった。したがって、ビフィドバクテリウム属細菌でも 5 F U / u p p 系がネガティブセレクションマーカーとして機能することが示唆された。

[0099] YIT 12819 Δ upp 及び u p p - t e t W カセットを用い、本発明の形質転換方法による標的遺伝子 (YIT 12819_00675~677 遺伝子群) の欠失株作出を試みた。本実施例の概略図を図 7 に示す。u p p - t e t W カセット挿入コロニーのポジティブセレクションにより、標的遺伝子が u p p - t e t W カセットに置換された株を得ることができた。この結果から、自然形質転換を応用すれば、任意の標的遺伝子を直鎖状 D N A に含まれる薬剤耐性 (マーカー) 遺伝子等に置換して破壊することが可能であることが実証された。続いて、u p p - t e t W カセット置換株を 5 F U 添加培地に塗抹し、ダイレクトリピート間で組み換えが生じ、5 F U 耐性を示す標的遺伝子が完全欠失株を得た。

以上より、本発明の形質転換法と 5 F U / u p p 系を組み合わせたゲノム操作が実現可能であることが実証された。

[0100] 実施例 5 ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータムの形質転換関連遺伝子の同定

(1) R N A s e q

実施例 3 で明らかとなった形質転換が促進 (塩化マグネシウム添加 (終濃

度 50 mM)、および浸透圧調整(終濃度 50 mMの非資化性糖フコース及び終濃度 50 mMの酢酸ナトリウム))又は抑制(pH 6.0、pH 9.0)される条件のmGAM寒天培地を調製した。各寒天培地に、実施例3(2)のDNAドナーと混合したYIT 12819の菌液を2点静置して一晩嫌気培養後、1点を用いて形質転換の頻度を確認し、残り1点からはtotal RNAを抽出した。各培地において形質転換の頻度が期待通り促進又は抑制されたことを確認した後、RNAseqを行い、遺伝子発現量を網羅的に解析した。total RNAは、ホットフェノール法により抽出した。DNase Iを用いてDNAを分解した後、PCI処理及びエタノール沈殿を行い、得られたRNAをNuclease Free Waterに溶解した。Bioanalyzer 2100及びRNA 6000 Nano LabChip kit(アジレント・テクノロジー株式会社)を用いてRNAの純度を確認し、全サンプルでRIN値が9~10であることを確認した。QIAseq FastSelect-5S/16S/23S(キアゲン)を用いてrRNAを除去後、QIAseq Stranded RNA Lib Kit(キアゲン)を用いてcDNAライブラリーを調製した。MiSeq及びMiSeq Reagent V3 Kit(150 cycles)(イリミナ株式会社)を用いてシーケンスを行い、75bpのペアエンドデータを得た。fastp(Chen et al., Bioinformatics 34(17), i884-i890)を用いてクオリティコントロールを行った後、SortMeRNA(Kopylova et al., Bioinformatics 28(24), 3211-3217)を用いてrRNA配列を除いた。Bowtie2(Langmead et al., Nature methods 9, 357-359)を用いてYIT 12819のゲノム配列にリードをマッピングし、featureCounts(Liao et al., Bioinformatics 30(7), 923-930)を用いて各遺伝子へのマッピングリード数を集計した。TPMを算出後、形質転換頻度と発現量が関連する遺伝子群を探索した。

[0101] (2) 遺伝子欠失株の作出

実施例4のマーカーレスゲノム操作方法を利用して、(1)で見出した各

遺伝子の欠失株を作出した。欠失株の作成に用いたプライマー、PCR条件を表9-1及び9-2に示す。各遺伝子上流領域及び下流領域をPCRにより増幅後、各断片とupper-tetWカセットをOE-PCRにより連結したコンストラクトを調製した。実施例4に記載のゲノム操作方法により、各遺伝子の欠失株を作出した。

[0102]

[表9-1]

プライマー名	標的遺伝子	配列 (5'-3')	配列番号	増幅産物長 (bp)	PCR条件
pili-up-f	上流	GAGACGGTTCAGGTTTCAG	57	1537	1
pili-up-r	領域	AGCAAAAGTTTCGGCAAGCATCGCAGGGTTCTCTCA	58		
pili-down-f	下流	AGAGGTGGGTGCAGACCTTGGAAACGTATGGCAATGGTGGTTC	59	2034	1
	領域	GCGCATCGGTGGAGGAACCTTGGATTGGTGGGAACGGTACA	60		
pili-down-r	上流	CGTGTCAAAGAAGAACGACGA	61	1050	2
com-up-f	領域	ATAATGGAAACGGCTCACAC	45		
com-up-r	下流	CAAAAGTTTCGGCAAGCAAGCTGCACAGATCAACG	46	1220	3
675-down-f	領域	AGAGGTGGGTGCAGACCTTGGTATCGGTGTCGATGCGTATGTTTGGAT	61		
		GGAATCCGTGATCTGTCAGGCTCTCGTTCATGTCACCTCGTTC	62	1302	4
675-down-r	上流	GATCAAGGCGTATGCAAGCT	63		
676-up-f	領域	CTCCATGCTGATTCGTGAGA	64	1312	3
676-up-r	下流	AAAAGTTCGGCAAGCGAGAACACACAACCGCCGATAC	65		
676-down-f	領域	AGAGGTGGGTGCAGATGACAGGTCTCATCTGTCGATGGCGGTGGCTTG	66	1253	2
		ACGCTCGTATCGGCGGTTGGTCTCTCAGAACGCTCCTTCGATATG	67		
676-down-r	上流	TAATCCGGTTTCCTCGTTC	68	1859	3
677-up-f	領域	GTTGATGCGTTCACAGGAG	69		
677-up-r	下流	AAAAGTTCGGCAAGCGTCCACCATATCGAAGGAGC	48		
677-down-f	領域	AGAGGTGGGTGCAGATGACCCACGGAAGCGCTGCCGATAGCCAT	69		
		CAGAACGCTCTCGATATGGTGGACGATTCAAGTCCAGCAGAAAGGA			
com-down-r		GAGACGAAGGTGGTGGTAT			

[表9-2]

プライマー名	標的遺伝子	配列 (5'→3')	配列番号	増幅産物長 (bp)	PCR条件		
comEA-up-f	YIT12819_00905	上流	70	1246	5		
comEA-up-r		領域	71				
comEA-down-f	YIT12819_00906	下流	72	1315		6	
comEA-down-r		領域	73				
		TGAGGATGATGGTGTGTGTCG					

a: 一重線はオーバーラップ領域、二重線はダイレクトリピート

PCR 条件

1. 94°C 2min, (98°C 10sec, 55°C 30sec, 68°C 3.5min)×30, 4°C ∞

2. 94°C 2min, (98°C 10sec, 55°C 30sec, 68°C 1.5min)×30, 4°C ∞

3. 94°C 2min, (98°C 10sec, 68°C 4min)×30, 4°C ∞

4. 94°C 2min, (98°C 10sec, 68°C 2min)×30, 4°C ∞

5. 94°C 2min, (98°C 10sec, 68°C 2min)×30, 4°C ∞

6. 94°C 2min, (98°C 10sec, 68°C 3.5min)×30, 4°C ∞

[0104] (3) 遺伝子欠失株における形質転換の頻度測定

実施例 3（3）に従って各遺伝子欠失株における形質転換頻度を測定した。

[0105]（4）結果

形質転換の頻度と発現量が関連する遺伝子を探索した結果、複数の遺伝子群が見出された。マーカーレスゲノム操作系を用いて各遺伝子の欠失株を作出し、形質転換頻度に与える影響を確認した結果、欠失させることで形質転換が完全に阻害される遺伝子として、T a d線毛遺伝子オペロン（YIT 12189_00143～00149）、DNA結合酵素（C o m E A）遺伝子／DNA取り込み酵素（C o m E C）遺伝子オペロン（YIT 12189_00905～00906）、DNAプロセッシング酵素（D p r A）遺伝子（YIT 12189_00675）、ヌクレアーゼ（Y r a N）遺伝子（YIT 12189_00677）及びヘリカーゼ（C o m M）遺伝子（YIT 12189_00676）を同定した（表 1 0）。これらが形質転換の関連遺伝子であることが明らかとなった。各遺伝子の推定機能は、グラム陽性菌における自然形質転換の分子モデル（Johnston, Calum, Bernard Martin, Gwennaele Fichant, Patrice Polard, and Jean-Pierre Claverys. 2014. Nature Reviews Microbiology 12(3):181-96.）とよく一致した。同定された遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列と、自然形質転換が生じることが確認されている菌種が有する各タンパク質とのアミノ酸配列との相同性はいずれも 3 0 %程度であった。したがって、この程度のアミノ酸相同性であっても機能は保存されていることがわかった。

[0106] [表10]

遺伝子ID	推定遺伝子産物 (KEGG orthology (or eggNOG description))	推定機能	配列番号
YIT12819_00143	flhG, flhN; flagellar biosynthesis protein	Tad線毛形成 (細胞外DNA結合)	1
YIT12819_00144	cpaF, tadA; pilus assembly protein		2
YIT12819_00145	tadB; tight adherence protein B		3
YIT12819_00146	tadC; tight adherence protein C		4
YIT12819_00147	(Protein of unknown function (DUF4244))		5
YIT12819_00148	tadE; tight adherence protein E		6
YIT12819_00149	(TIGRFAM helicase secretion neighborhood TadE-like protein)		7
YIT12819_00675	dprA; DNA processing protein	相同組み換え促進	8
YIT12819_00676	comM; magnesium chelatase family protein	核膜解離 (ComMヘリカーゼ)	9
YIT12819_00677	grnA; putative endonuclease	DNA一本鎖化ヌクレアーゼ	10
YIT12819_00905	comEA; competence protein	DNA結合・取り込み	11
YIT12819_00906	comEC; competence protein		12

[0107] 以上の結果から、レシピエントの線毛が菌体外のドナーのDNAをキャプチャする、二本鎖DNAを一本鎖化する酵素の働きによりキャプチャしたD

NAを一本鎖化する、一本鎖DNAをDNA取り込み酵素が菌体内に輸送する、一本鎖DNA結合タンパク質が一本鎖DNAを認識し、組み換え酵素を呼び込む、ヘリカーゼがゲノムの二本鎖DNAを解離させる、レシピエントのゲノム中で相同組み換えが生じる、とのメカニズムにより、ドナーからレシピエントのビフィドバクテリウム属細菌にドナー由来のDNAが導入されると推測される。

[0108] 実施例6 ビフィドバクテリウム属細菌における遺伝子の分布

 主要なヒト常在ビフィドバクテリウム属細菌種における上記表10に示す遺伝子の分布を解析した。公共データベースから主要なヒト常在ビフィズス菌5菌種486株（表11）のゲノムをダウンロードし、上記表10に示す遺伝子のホモログ（アミノ酸配列をクエリとしたblastp検索でevalue<1e-10を満たす配列）を探索し、菌種ごとにホモログ保有株の比率を算出した。必須遺伝子の結果を表12に示す。ほぼ全ての菌種及び菌株がYIT_12819_00148を除く遺伝子のホモログを保有していることが明らかとなった。

[0109] [表11]

	株数
B. pseudocatenulatum	102
B. adolescentis	49
B. longum subsp. longum	151
B. breve	99
B. bifidum	85

[0110]

[表12]

遺伝子ID	<i>B. pse</i>	<i>B. ado</i>	<i>B. lon</i>	<i>B. bre</i>	<i>B. bif</i>
YIT12819_00143	100%	100%	100%	99%	100%
YIT12819_00144	100%	100%	100%	99%	100%
YIT12819_00145	100%	100%	100%	100%	100%
YIT12819_00146	100%	100%	100%	100%	95%
YIT12819_00147	100%	100%	100%	100%	100%
YIT12819_00148	100%	100%	0%	99%	51%
YIT12819_00149	100%	100%	100%	100%	100%
YIT12819_00675	100%	100%	100%	99%	100%
YIT12819_00676	100%	100%	100%	99%	100%
YIT12819_00677	100%	100%	100%	100%	100%
YIT12819_00905	100%	100%	100%	100%	100%
YIT12819_00906	100%	98%	100%	100%	100%

[0111] 実施例7 ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換の検証

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム以外の2菌種（ビフィドバクテリウム・ブレーベ及びビフィドバクテリウム・ロンガム）においても形質転換が生じるのか検証した。

[0112] (1) 使用菌株

ビフィドバクテリウム・ブレーベの検証には、E m耐性株（BR-Cw104-C2株）とE m感受性株（BR-Cw104-A1株）を用いた。ビフィドバクテリウム・ロンガムの検証には、ガラクトン資化性かつE m感受性株（YIT 12762）とガラクトン非資化性かつE m耐性株（YIT 12812）を用いた。異菌種間での検証にはE m耐性のビフィドバクテリウム・ロンガム（L0-Cw098-B4株）とE m感受性のビフィドバクテリウム・ブレーベ（BR-Cw104-A1株）を用いた。

[0113] (2) 形質転換

ビフィドバクテリウム・ブレーベについては、実施例2（3）と同様の操作でE m耐性株（BR-Cw104-C2株）の加熱死菌体を調製した。加熱死菌体をドナー、E m感受性株（BR-Cw104-A1株）をレシピエントとして、実施例2（4）と同様に形質転換を行い、E m（1 μ g/mL）添加mGAML（E m-mGAML）寒天培地に塗抹した。シングルコロニーを取得後、このように

得られた形質転換体のゲノム解析を実施例 1 (3) と同様にして行った。

[0114] ビフィドバクテリウム・ロンガムについては、実施例 2 (4) と同様に、YIT 12762 の生菌体及び YIT 12812 の生菌体を用いて形質転換を行い、形質転換後の菌体をガラクトン (終濃度 0.5%) 及び Em (1 μ g/mL) 含有 mPY 培地 (PY-ガラクトン-エリスロマイシン培地) に植菌した。2 日目に増殖が認められた菌液を、再度新鮮な同培地に 1% 量継代した。更に 2 日後、増殖が認められた菌液を同培地に 1% 量継代した。その翌日、増殖した菌液を Em 添加 mGAM 寒天培地に画線塗抹し、シングルコロニーを取得した。このように得られた形質転換体のゲノム解析を実施例 1 (3) と同様にして行った。

[0115] ビフィドバクテリウム・ロンガムとビフィドバクテリウム・ブレーベの組み合わせについては、実施例 2 (3) と同様の操作でビフィドバクテリウム・ロンガムの Em 耐性株 (L0-Cw098-B4 株) の加熱死菌体をドナー、ビフィドバクテリウム・ロンガムの Em 感受性株 (BR-Cw104-A1 株) をレシピエントとして、実施例 2 (4) と同様に形質転換を行い、Em (1 μ g/mL) 添加 mGAML (Em-mGAML) 寒天培地に塗抹した。シングルコロニーを取得後、このように得られた形質転換体のゲノム解析を実施例 1 (3) と同様にして行った。

[0116] (3) 結果

ビフィドバクテリウム・ブレーベで形質転換が生じ、ドナーの染色体上の Em 耐性遺伝子がレシピエントに伝播することを確認した (図 8 A)。Em 耐性遺伝子が伝播した株は、Em-mGAML 培地で増殖できることを確認した (図 9 A)。

同様に、ビフィドバクテリウム・ロンガムでも形質転換が生じ、ドナーの染色体上の Em 耐性遺伝子がレシピエントに伝播することを確認した (図 8 B)。Em 耐性遺伝子が伝播した株は、Em-mGAML 培地で増殖できることを確認した (図 9 B)。

また、ビフィドバクテリウム・ロンガムをドナー、ビフィドバクテリウム

・ブレーベをレシピエントとした組み合わせでも形質転換が生じ、ドナーの染色体上のEm耐性遺伝子がレシピエントに伝播することを確認した（図8C）。Em耐性遺伝子が伝播した株は、Em-mGAML培地で増殖できることを確認した（図9C）。このことから、同種間に限らず、異種間でも形質転換が生じることが明らかとなった。

以上より、上記表10の遺伝子が保存された菌種では実際に形質転換が生じることがわかった。また、YIT12189_00148を持たないビフィドバクテリウム・ロンガムでも形質転換が生じたことから（図8B）、本遺伝子を有さなくてもTad線毛が形成され、形質転換が生じ得ることがわかった。

[0117] 実施例8 ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換を応用したグルコース資化能の復元

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 11057は、腸内で活発に糖を代謝して有機酸を産生することが期待される新規プロバイオティクス候補株である。発酵乳製造への利用を考慮し、YIT 11057について乳培地での生残性を高めるべくUV照射及び長期継代による育種を行い、乳培地での生残性が改善されたビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム Y 51493が得られた。しかし、Y 51493は育種の過程でグルコース資化能を失っていた。ゲノム解析の結果、Y 51493ではグルコース輸送体（beta-glucoside PTS system EIIICBA component）をコードする遺伝子（配列番号14）の369位のC塩基が1塩基欠失していたことから、フレームシフトが生じてアミノ酸配列が大きく変化し、その結果、細胞内へのグルコースの輸送ができなくなったと考えられた。腸内における糖代謝の点から、グルコース資化能は維持しておいたほうが望ましい。一方で、塩基の欠失を従来のUV照射や長期継代で復元するのは非現実的である。そこで、Y 51493を親株、すなわちレシピエントとして、本発明の形質転換方法での育種によるグルコース資化能の復元を行った。

[0118] （1）使用菌株

ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム Y 51493をレシピエント

として用いた。

[0119] (2) ドナーDNA

YIT 11057をmGAML液体培地で一晚培養した菌液1 mLから、ビーズフェノール法で抽出したゲノムDNAを用いた。

[0120] (3) 形質転換及びグルコース資化能復元菌体の選抜

全ての操作は嫌気グローブボックス内で行った。Y 51493の凍結菌体をmGAML寒天培地に植菌して一晚嫌気培養した。翌朝、複数のコロニーを同時に掻き取り同液体培地400 μ Lに継代した。3～4時間培養後、同液体培地を1600 μ L追加して4～5時間培養した。遠心分離後、菌体ペレットを500 μ LのmPY液体培地で1回洗浄し、ペレットを同液体培地180 μ Lに懸濁した。菌液と等量のDNA溶液（エタノール沈殿後にTEバッファーに溶解したYIT 11057のゲノムDNA）を混合後、10 μ Lを50 mM塩化マグネシウム添加mGAM寒天培地上にスポットして、液体が乾燥するまで数分間静置後、37℃で嫌気培養した。同寒天培地は使用当日にオートクレーブ滅菌したものを用いた。16時間後、菌体ペレットを1 μ Lループで全量掻き取り、500 μ LのmPY液体培地に懸濁した。このうち50 μ Lを分取し、0.5%グルコース添加mPY液体培地640 μ Lに懸濁した。このうち200 μ Lを96穴プレートに分取し、50 μ Lのミネラルオイルを重層後、マイクロプレートリーダーPowerWave 340（バイオテック社）を用いて増殖曲線を取得した。残りの菌液は、1.5 mLチューブで37℃で嫌気培養を行った。PC画面上で濁度の上昇が確認された場合、1.5 mLチューブ中の菌液10 μ Lを新鮮な同液体培地500 μ Lに継代し、96穴プレートと1.5 mLチューブに分けて再び増殖をモニタリングした。その後に増殖が確認された場合、1.5 mLチューブ中の菌液をmGAML寒天培地に画線塗抹し、シングルコロニーを単離後、グリセロールに懸濁して-80℃で保存した。単離株の菌体を0.5%グルコース添加mPY液体培地に懸濁し、増殖性を確認した。単離株の完全長ゲノムを実施例1(3)に記載の手順で決定した。

[0121] (4) グルコースの資化性試験

(3) で得られた単離株の凍結菌液を m G A M L 寒天培地に植菌し、一晚培養して得られたコロニーを掻き取り、m G A M L 液体培地に植菌して前培養を行った。5～6時間後にマイクロプレートリーダー P o w e r W a v e 3 4 0 を用いて OD_{600} を測定した。残存菌液 1 0 0 μ L を遠心し、上清を除去後、 $OD_{600}=0.2$ となるように m P Y 培地に懸濁した。96穴プレートにグルコースを 0.5% 添加した m P Y 培地 1 9 8 μ L を分注し、菌液 2 μ L を添加後、5 0 μ L のミネラルオイルを重層して、P o w e r W a v e 3 4 0 内で 3 7 $^{\circ}$ C で培養して増殖曲線を取得した。

[0122] (5) 変異部位の解析

YIT 11057 の完全長ゲノムをリファレンスとして、(3) で得られた菌株に生じた変異を探索した。まず s n i p p y を用いて S N P s を同定した。また、m a u v e (Darling et al., Genome Research 14, 1394-1403) を用いて大規模なゲノム変化及び s n i p p y では検出されなかった S N P s を目視で確認した。

[0123] (6) 結果

YIT 11057 から抽出した D N A をドナー、Y 51493 の生菌体をレシピエントとして形質転換を行った結果、グルコースを唯一の糖源とする液体培地で増殖する形質転換体ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム YIT 13179 が得られた。YIT 13179 のグルコース資化性を確認した結果、グルコースを資化することが確認された (図 1 0)。

YIT 13179 の完全長ゲノムを決定し、グルコース輸送体遺伝子の塩基配列を確認したところ、YIT 13179 では、Y 51493 で生じていた 1 塩基の欠失が回復しており、遺伝子の全長が YIT 11057 と同一配列であった。

[0124] YIT 11057 から Y 51493 への育種の過程で、ゲノム 1 5 箇所に変異が入っており、これらは乳培地での生残性の改善に寄与すると予想される。このうち、YIT 13179 では 1 箇所のみが YIT 11057 の配列に復元していた。復元した変異は、グルコース輸送体遺伝子の欠失であった。

[0125] 以上の結果より、本発明の形質転換方法によれば、従来の育種方法では取得困難な 1 塩基の欠失を復元した株であっても容易に取得できることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] ビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法であって、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌と、当該レシピエントに導入するDNAを含むドナーとしての細菌又は直鎖状DNAとを、接触させ、静置培養することを含み、当該静置培養に用いる培地がpH 6.0以上10.0未満であり、かつ当該レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 $\times$ （質量％）が、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (\text{pH}) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ を満たす培地である、方法。
- [請求項2] ビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法であって、レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌と、ドナーとしての直鎖状DNAとを、接触させ、静置培養することを含み、当該静置培養に用いる培地がpH 6.0以上10.0未満であり、かつ当該レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 $\times$ （質量％）が、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (\text{pH}) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (\text{pH}) - 1.2$ を満たす培地であり、当該レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌がupp遺伝子を有さないビフィドバクテリウム属細菌であり、
- 当該ドナーとしての直鎖状DNAが上流ホモロジーアーム、選択マーカー遺伝子及びupp遺伝子の2種の遺伝子、並びに下流ホモロジーアームを含み、当該2種の遺伝子は当該上流ホモロジーアーム及び当該下流ホモロジーアームの間に配置され、かつ当該2種の遺伝子と当該下流ホモロジーアームの間に当該上流ホモロジーアームの3'末端領域を含むか、当該上流ホモロジーアームと当該2種の遺伝子の間に当該下流ホモロジーアームの5'末端領域を含む、
- 方法。

- [請求項3] 前記レシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌がTad線毛遺伝子オペロン、DNA結合酵素(ComEA)遺伝子/DNA取り込み酵素(ComEC)遺伝子オペロン、DNAプロセッシング酵素(DprA)遺伝子、ヌクレアーゼ(YraN)遺伝子及びヘリカーゼ(ComM)遺伝子からなる群より選択される少なくとも1種をゲノム上に有するビフィドバクテリウム属細菌である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 前記培地の浸透圧が110～750mOsmである、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項5] 前記培地がMgCl₂を3～180mM含有する、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項6] 請求項1記載のビフィドバクテリウム属細菌の形質転換方法又は請求項2記載のビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法に用いられる培地であって、pH6.0以上10.0未満であり、かつレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 x (質量%)が、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (pH) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (pH) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (pH) - 1.2$ を満たす、培地。
- [請求項7] 請求項2記載のビフィドバクテリウム属細菌のゲノム操作方法に用いられるキットであって、pH6.0以上10.0未満であり、かつレシピエントとしてのビフィドバクテリウム属細菌が資化可能な糖類の含有量 x (質量%)が、pHが6.0以上8.5未満の場合に $0 < x \leq 0.2 \times (pH) - 1.2$ 、pHが8.5以上10.0未満の場合に $0.2 \times (pH) - 1.7 < x \leq 0.2 \times (pH) - 1.2$ を満たす培地、並びに選択マーカー遺伝子及びupp遺伝子を含む直鎖状DNAを含有するキット。