

組換え微生物の安全性に関する研究

研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長

研究要旨:

遺伝子組換え微生物の利用を実用化するにあたって障害となっており、検討が必要とされている安全性に関する項目としては、組換え微生物のヒトや動物の免疫系への影響評価や腸内フローラを介した健康影響が重要であるとされている。本分担研究では遺伝子組換え技術を用いてモデル組換え細菌を作出し、それらの組換え体を用いて細胞や実験動物を用いた実験により、上述の組換え微生物の安全性に関する知見を集積すると共に、安全性評価手法の開発を行う。

大腸菌と乳酸菌を宿主として、M細胞への取り込みに重要な働きをすることが知られているエルシニアの Invasin を発現する遺伝子組換え体を作成し、ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜を用いて、評価を行った。大腸菌では、Invasin を発現する組換え体で取り込みが増強されたのに対し、乳酸菌組換え体ではそのような取り込みの増強は確認できなかった。大腸菌組換え体の取り込みの増強は、クラスリンを介した取り込み機構が主であることが確認された。細胞を用いた評価系が示した結果は、ヒトや動物の腸管の M 細胞でも実際に同様に起こっているかは大変重要であり検討を進めた。また、この現象のメカニズムの解明に向けて、実用性が高いヒト M 細胞モデル系の更なる改良を行った。

協力研究者

榎田 和彌 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
江川 智哉 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部

なった免疫影響が観察されることがある。平成25年度はこの点について引き続き検討を行った。

平成24年度には免疫系に影響を及ぼすことが期待される遺伝子を組み込み、モデル組換え体を作成した。エルシニアの侵入因子である Invasin を発現する遺伝子組換え大腸菌および同様な遺伝子を挿入した組換え乳酸菌を用いて、これらのモデル組換え体とそれぞれの宿主菌の挙動を比較しながら、分子レベルでの比較検討を行った。評価系は、消化管からの免疫抗原の取り込みに重要な働きをする腸管上皮細胞に存在する M 細胞に相当する2細胞共存型の評価系を用いて検討した。動物愛護の精神から、動物による評価を最小限に留めるため、免疫系への影響の概要については継代細胞を用いた評価系を作成した。腸管上皮細胞 C2BBel 細胞と免疫担当細胞 Raji 細胞の共培養による M 細胞評価系を用いて、遺伝子組換えモデル

A. 研究目的

モデル組換え体を作成し組換え微生物で特に重要と思われる安全性に関する知見を集積し、これらの検討により得られた有用な安全性評価手法を提供する。これまでの研究により、遺伝子組換え乳酸菌の免疫系への影響は、組み込む遺伝子産物単体の性質を必ずしも反映しないことが示されており、用いた宿主乳酸菌と挿入遺伝子産物の組合せにより多様な免疫影響が起こることが示されており、挿入遺伝子産物単体の示す免疫影響とは異

乳酸菌と大腸菌での免疫への影響の違いについて検討し、大腸菌と乳酸菌でその挙動が全く異なることを報告した。

平成 25 年度は、ヒト M 細胞モデル系の改良として、トランスフェクションを利用した腸管上皮細胞単層モデルの構築を試み、評価系として実用性が高く、前年度得られた大腸菌と乳酸菌の挙動の違いを分子レベルで解明することを目標に研究を進めた。

B. 研究方法

ヒト腸管モデル細胞 C2BBE1 単層膜への *spiB* 遺伝子の導入

実験の概要は、図 1 に示した。

1. 使用細胞及び培養条件

ヒト結腸癌由来の C2BBE1 細胞 (ATCC CRL-2102) は 10 % FBS、1 % GlutaMax (Gibco)、penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Gibco)、Transferrin (Merck Millipore) を含む DMEM (Sigma) を用い、5 % CO₂ 存在下、37 °C で培養した。

ヒトパーキットリンパ腫由来の Raji 細胞 (RBRC-RCB1647) は 10 % FBS (Gibco)、penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Gibco) を含む RPMI 1640 (Sigma) を用い 5 % CO₂ 存在下、37 °C で培養した。

2. *spiB* 遺伝子の発現確認および *spiB* 遺伝子のクローニング

C2BBE1 細胞および Raji 細胞を培養後、RNeasy Mini kit (Qiagen) により RNA を抽出した。抽出した RNA を Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche) により逆転写し、cDNA を調整した。調整した cDNA を鋳型とし PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて PCR により *spiB* 遺伝子を増幅した。プライマーは 5' -aaaactcgagatgctcgccctggaggctgc と 5' -ggaagatcttcaggccccggcgactgcag を用い、PCR の条件はメーカーの指示書に従った。

3. *spiB* 遺伝子発現用プラスミドの作成

テトラサイクリン誘導プラスミド pTRE3G (Clontech) を FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) により大腸菌から抽出後、BamHI (TaKaRa) および XhoI (TaKaRa) を添加し、37 °C で制限酵素処理した。

PCR により増幅した *spiB* 遺伝子は BglII (TaKaRa) および XhoI を添加し、37 °C で制限酵素処理を行った。

プラスミドおよび PCR 産物を FastGene Gel/PCR Extraction (日本ジェネティクス) により精製後、T4 DNA ligase (Invitrogen) を加えそれぞれの断片を結合し、*Escherichia coli* JM109 (ニッポンジーン) の形質転換を行った。

4. C2BBE1 細胞への Tet-On 調節ベクターの導入

C2BBE1 細胞を 4.0 x 10⁴/well の濃度で 24 穴プレートに播種し 2 日間培養後、Lipofectamine (Invitrogen) を用いて pCMV-Tet3G (Clontech) のトランスフェクションを行った。トランスフェクションの条件はメーカーの指示書に従った。

トランスフェクションした細胞を継代培養後、ネオマイシン G418 (Clontech) を 400 µg/ml の濃度で添加し、生育が良好な細胞を選抜した。

5. 安定細胞株の目的遺伝子の発現誘導能

安定細胞株の目的遺伝子の誘導効率をルシフェラーゼアッセイにより測定した。ルシフェラーゼ発現プラスミドを一時的に安定細胞株に導入後、doxycycline (Clontech) を 1.0 µg/ml の濃度で添加しルシフェラーゼの発現を誘導した。ルシフェラーゼの活性は Luciferase Assay Systems (Promega) を用い、GloMax-Multi Detection System (Promega) により測定し、活性の高いクローンを選抜した。

6. *spiB* を発現する二重安定細胞株の作成

選抜した安定細胞株をトランスフェクション法に適した密度になるまで培養し、pTRE3G::*spiB* および Hygromycin 耐性遺伝子のトランスフェクシ

オンを行った。トランスフェクション後、400 µg/ml Hygromycin (Clontech) 存在下で培養し、二重安定細胞株を作成した。

二重安定細胞株の *spiB* RNA の発現は RNA 抽出後、cDNA を合成し *spiB* 増幅プライマーにより検出した。

C. 研究結果

ヒト腸管モデル細胞 C2BBe1 単層膜への *spiB* 遺伝子の導入

1. *spiB* RNA の検出およびプラスミドの作成

C2BBe1 細胞および Raji 細胞の RNA を抽出し *spiB* の転写段階での発現を確認した。*spiB* 増幅用プライマーによる cDNA を鋳型とした PCR の結果、C2BBe1 細胞の RNA から *spiB* 遺伝子の増幅は見られなかったが、Raji 細胞の RNA からは増幅が確認された(図2)。

Raji 細胞由来の cDNA から得られた *spiB* 遺伝子はシーケンス確認後、哺乳類細胞発現用プラスミド pTRE3G へクローニングした。

2. テトラサイクリン発現誘導安定細胞株の樹立

C2BBe1 細胞にプラスミド pTRE3G をトランスフェクション法により導入し、ネオマイシン G418 存在下で培養した結果、134 コロニーが得られた。30 クローンを選抜、培養し、生育が良好な 18 クローンを選抜した。これらのクローンに対しルシフェラーゼ発現用プラスミドを導入し、ルシフェラーゼ活性によるスクリーニングを行い、誘導が良好なクローンを確認した(図3)。

3. *spiB* 発現二重安定細胞株の樹立

樹立した安定細胞株に対し *spiB* 発現用プラスミドをトランスフェクション法により導入し、130 コロニーを得た。生育が良好な 30 クローンから RNA を抽出し、*spiB* RNA の発現を PCR により検出した結果、3 クローンから *spiB* RNA の発現を確認した(図4)。

D. 考察

腸管内の抗原取り組み口である「M細胞」の分化に必須である転写因子が新たに報告された(Kanaya et al. Nature Immunology, 2012)ことから、これまでの実験に用いていた、2細胞共存実験系を、腸管上皮細胞のトランスフェクションにより単層培養系に改良することとした。M細胞への分化に関わる *spiB* をコードする遺伝子の cDNA を Raji 細胞からクローニングし、C2BBe1 細胞にプラスミド pTRE3G を用いてトランスフェクション法により導入することにより、単層のM細胞系を作出することを試みた。

これまで用いてきた異なった2細胞の共存系では、上皮細胞の単層膜形成に2週間、その後さらに Raji 細胞との共存によりM細胞への分化させるために1週間が必要であり、実際のM細胞としての実験までに3週間以上が必要である。

今回の検討は、ヒト腸管上皮由来である C2BBe1 細胞をM細胞への分化に関わる *spiB* 遺伝子産物のもつ機能によりM細胞活性を付与し、腸管内の免疫抗原の取り込まれ方に関する評価を行うことを想定している。

トランスフェクションにより、生育が良好な 30 クローンを得ることができ、そのうち RNA を抽出し、*spiB* RNA の発現を PCR により検出した結果、3 クローンから *spiB* RNA の発現を確認することができた。これらのクローンは、テトラサイクリン発現誘導安定細胞株である今回用いたのは市販の哺乳類細胞におけるテトラサイクリン発現誘導システムを利用しているため、遺伝子発現をドキシサイクリンの用量依存的に調節可能である。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用いて確認したところ、この細胞でトランスフェクションにより導入したシステムが有効に機能していることが確認された。

E. 結論

大腸菌と乳酸菌を宿主として、M細胞への取り込みに重要な働きをすることが知られているエルシニアの Invasin を発現する遺伝子組換え体を作成し、ヒト腸管上皮細胞 C2BBe1 単層膜を Raji 細胞と共存させることにより M 細胞化することに成功し、この評価系を用いて、評価を行った。大腸菌では、Invasin を発現する組換え体で取り込みが増強されたのに対し、乳酸菌組換え体ではそのような取り込みの増強は確認できなかった。大腸菌組換え体の取り込みの増強は、クラスリンを介した取り込み機構が主であることが確認された。しかし、この評価系は M 細胞化するのに最低 3 週間を必要とし、実用的ではないため改良型の評価系の構築を試みた。

ヒト腸管上皮細胞 C2BBe1 細胞へトランスフェクションにより、M 細胞への分化に必須である *spiB* を、ドキシサイクリンの用量依存的に発現を調節可能な 3 つのクローンを作成することができた。今後、この細胞を用いて、M 細胞のマーカーの評価、2 細胞系で観察された M 細胞としての機能の評価を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Toh H, Oshima K, Nakano A, Takahata M, Murakami M, Takaki T, Nishiyama H, Igimi S, Hattori M, Morita H. Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. PLOS one. 8(10): e75073. (2013)

2. 学会発表

五十君静信：プロバイオティクスの安全性評価について。2013 年度日本乳酸菌学会秋期セミナー。

2013 年 11 月。東京

3. その他発表

五十君静信：プロバイオティクスの安全性をどう考えるか。日本生菌製剤協会講演会。

2013 年 5 月。東京

五十君静信：遺伝子組換え技術による乳酸菌の新しい機能の開発。明治大学大学院特別講義。

2013 年 11 月