

きるが A と B を交配してできた C 家系では A 家系から受け継いだ遺伝子が働き、B 家系から引き継いだ PGC の移動を抑えるのに重要な働きをする遺伝子を活性化させ、結果的に PGC が移動できなくなり生殖細胞ができず、不妊化するという特許を米国で取得した (Pub.No.US2014/0331346 A1))¹⁶⁾。

2. 遺伝子組換えアマゴの作出

3 組の異なったアマゴを用いて、それぞれ 105 粒、106 粒及び 128 粒の受精卵にベニザケメタロチオネインプロモーターの下流にベニザデ GH ゲノム遺伝子をつなげた配列を 50ng/μl になるようにリバーズ PBS で調整してマイクロインジェクションした。ふ化率はコントロールが 52.4、7.7 及び 7.6%であったのに対し、マイクロインジェクション区ではそれぞれ 18.1、13.2 及び 27.3%と低い値であった。ふ化死魚はマイクロインジェクション区で合計 399 尾がふ化した。2014 年 4 月現在 61 尾が生存して、飼育中である。昨年マイクロインジェクションしたアマゴも 2 尾生存しており、飼育中である。

H24 と H25 年にベニザケメタロチオネインプロモーターの下流にベニザデ GH ゲノム遺伝子をつなげた配列をマイクロインジェクションした個体の一部が成熟した。H24 年作出の成熟した雌雄 2 尾と H25 年作出の雄 5 尾を用いて、非遺伝子組換え魚の卵及び精子と受精した結果、受精率、生存率はコントロールと全く同等であった。これらの F1 は成長差を確認するため現在飼育中である。

3. 遺伝子組換えアマゴの肝臓における脂質代謝の解析

Tg/Tg (導入遺伝子が 2 セット入っている個体、ホモ個体) とコントロール (非遺伝子組換え魚) のそれぞれ 5 検体ずつの肝臓から抽出した mRNA を用いて cDNA ライブラリーを構築し、そのライブラリーを Illumina GA IIx sequencer で解析した。その結果、Tg/Tg は 130 万、コントロールは 160

万リードの遺伝子断片がシーケンスされ、解析された塩基配列は NCBI に登録されている大西洋サケ (*Salmo salar*) とニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の遺伝子配列とのマッピングを行い、Tg/Tg とコントロールの肝臓における約 8000 種類の遺伝子に関する発現量の変化を比較することができた。

次に、イルミナ解析で得られたデータから脂質代謝に関連する遺伝子の発現変化を調べた結果、Tg/Tg の肝臓では脂肪酸の伸長や修飾に関する $\Delta 6$ FAD、delta 9 desaturase、elongation of long chain fatty acids 5b、thioesterase-B 遺伝子の発現低下がみられた。このことから、GH 遺伝子組換えアマゴの肝臓では脂肪酸組成にも変化があることが推測された。

そこで、ガスクロマトグラフィーを用いて、GH 遺伝子組換えアマゴ (Tg/Tg、Tg+ (導入遺伝子が 1 セット入っている個体、ヘテロ個体)) と年齢コントロール (年齢が一緒のコントロール) の肝臓と筋肉の脂肪酸分析を行った。その結果、まず肝臓では GH 遺伝子組換えアマゴとコントロール間で総脂肪酸量に殆ど差はなかったが、GH 遺伝子組換えアマゴでは飽和脂肪酸 (SFA) やモノ不飽和脂肪酸 (MUFA) の割合が減少し、PUFA の割合が増加していることが明らかとなった。このことから、GH 遺伝子組換えアマゴの肝臓では脂肪酸の異化反応が活発になっていることが予測された。そのため、脂肪酸の異化反応に関連する遺伝子の発現変化をイルミナ解析のデータから調べた結果、脂肪酸の生分解や生合成の代謝中間体である脂肪酸-acyl CoA の合成に関与することが知られている Long-chain-fatty-acid-CoA ligase1 (ACSL1) と分岐脂肪酸の β 酸化に関与する Acyl-CoA oxidase 3 遺伝子の発現が増加していることが明らかとなった。合成された脂肪酸-acyl CoA は β 酸化によって Acetyl-CoA となってエネルギー産生に利用されるか、トリアシルグリセロール (TAG) の形で蓄積される方向に代謝される。血清 TAG を測定した結果、GH 遺伝子組換えアマ

ゴではコントロールに比べ有意に低下($P<0.05$)しており、更にはケトン体として知られる 3-hydroxybutyric acid (3-HB) が GH 遺伝子組換えアマゴの肝臓では増加していることがメタボローム解析によって明らかとなった。このことから GH 遺伝子組換えアマゴの肝臓は脂肪酸を蓄積するよりも、 β 酸化を活発にさせて高成長の維持に必要なエネルギーの生産を増加させていることが示唆された。

その一方で、GH 遺伝子組換えアマゴでは魚類にとって重要なエネルギー源である脂肪組織が著しく減少していることと、GH 遺伝子組換えアマゴの肝臓で 3-HB が増加していることから、飢餓の可能性が示唆された。そこで血清グルコースを測定した結果、GH 遺伝子組換えアマゴではコントロールに比べ有意に低下($P<0.05$)していた。また、イルミナ解析の結果から、Tg/Tg の肝臓では飢餓応答遺伝子である glucose-regulated protein 78kDa 遺伝子の発現増加と、Mid1 interacting protein 1 (Mid1ip1) 遺伝子の発現低下がみられた。さらに Mid1ip1 は de novo 脂肪酸合成にも関与するため、GH 遺伝子組換えアマゴの肝臓では SFA や MUFA などの脂肪酸合成経路が抑制されていることも示唆された。

一方、これら組換え体と年齢コントロールの筋肉の脂肪酸比較では、アマゴ筋肉の主な 1 価の不飽和脂肪酸である Oleic acid (18:1n-9) と Palmitoleic acid (16:1n-7) は肝臓での脂肪酸組成含量と類似したパターンを示し、コントロールで高く、ヘテロ、ホモの順に低下することが判った。一方、多価不飽和脂肪酸も肝臓と同様にコントロールで低くヘテロ、ホモと増加する傾向を示した。しかしながら、飽和脂肪酸である Palmitic acid (16:0) と Stearic acid (18:0) はコントロールに較べ組換え体で含量が高かった。また、肝臓ではコントロールと差が見られなかった 22:6n-3 と 20:5n-3 も顕著にコントロールに較べて組換え体で含量が増加していた。

D. 考察

米国における遺伝子組換え大西洋サケの認可に関する状況はこの 3 年間の間全く変わっていない。しかし、遺伝子組換え大西洋サケをふ化させるカナダ施設の認可や養殖するためのパナマ施設の認可をすでに受けており、いつでも大量生産可能な状況であると思われる。

遺伝子組換え魚に関する文献調査では遺伝子組換え魚のリスク研究の考察や、実際に遺伝子組換え魚を用いた生理・生態研究が報告されている。

GH 導入遺伝子組換えアマゴの肝臓を用いた研究では 22:6n-3 は餌の中に多量に含まれているため、大食である組換え体ではこの含量が高い事が推測されたが、組換え体の肝臓では減少し、筋肉では増加している事が明らかになった。一般に、この脂肪酸量は組織の炎症反応 (CPR 値) の状態と反比例することが知られていることから、組換え体の肝臓では何かしらの炎症が起きている可能性を示唆した。しかし、これらの結果は実験モデルとした組換えアマゴを用いた結果であって、導入遺伝子の挿入位置、コピー数等が異なれば違った結果が得られることが予想される。

E. 結論

遺伝子組換え大西洋サケはすべての審査が FDA で終了したが、未だに許可されていない状況である。カナダ環境省は AquaBouty Technologies 社の研究施設を種苗生産施設として認めた。

遺伝子組換え魚に関する論文は作出された遺伝子組換え魚を用いた生理・生態研究が多く報告されるようになった。また、リスク研究に関する論文も報告されるようになった。

GH を導入した遺伝子組換えアマゴをモデルとした実験では肝臓中に認められた形態的变化は成長ホルモンの量が原因で無く、遺伝子組換えが原因であることが示唆されたが、遺伝子組換え大西洋サケでは特に肝臓等の変化については報告が無く、ここの遺伝子組換え魚の導入部位やコピー数等の影響について、改めて個々に検査する重

要性が示唆された。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugiyama M, Takenaga F, Okamoto H, Masaoka T, Araki K, Nagoya H, Mori T. (2014) Fatty acid content in muscles of amago salmon homozygous or heterozygous for a growth hormone transgene. AQUACULTURE 435: 377-380.

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

I. 参考文献

1) Lian *et al.* (2013) Transgenic common carp do not have the ability to expand populations. PLOS ONE 8(6), 1-6.

2) Zhong *et al.* (2013) Increased food intake in growth hormone-transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.) may be mediated by upregulating agouti-related protein (AgRP). Gen. Comp. Endocrinol. 192, 81-88.

3) Lo JH, Lin CM, Chen MJ, Chen TT. (2014) Altered gene expression patterns of innate and adaptive immunity pathways in transgenic rainbow trout harboring Cecropin P1 transgene. BMC GENOMICS 15, 887.

4) Muscle fibre size optimisation provides flexibility

for energy budgeting in calorie-restricted coho salmon transgenic for growth hormone. Johnston IA, de la Serrana DG, Devlin RH. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY 217(19), 3392-3395, 2014

5) Leggatt RA, Hollo T, Vandersteen WE, McFarlane K, Goh B, Prevost J, Devlin RH. (2014) Rearing in Seawater Mesocosms Improves the Spawning Performance of Growth Hormone Transgenic and Wild-Type Coho Salmon. PLOS ONE 9 (8), e105377.

6) Polymeropoulos ET, Plouffe D, LeBlanc S, Elliott NG, Currie S, Frappell PB. (2014) Growth hormone transgenesis and polyploidy increase metabolic rate, alter the cardiorespiratory response and influence HSP expression in response to acute hypoxia in Atlantic salmon (*Salmo salar*) yolksac alevins. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY 217(13), 2268-2276.

7) Dana GV, Cooper AM, Pennington KM, Sharpe LM. (2014) Methodologies and special considerations for environmental risk analysis of genetically modified aquatic biocontrol organisms. BIOLOGICAL INVASIONS 16(6), 1257-1272.

8) Chiou PP, Chen MJ, Lin CM, Khoo J, Larson J, Holt R, Leong JA, Thorgarrd G, Chen TT. (2014) Production of Homozygous Transgenic Rainbow Trout with Enhanced Disease Resistance. MARINE BIOTECHNOLOGY 16(3), 299-308.

9) Zhang L, Gozlan RE, Li Z, Liu J, Zhang T, Hu W, Zhu Z. (2014) Rapid growth increases intrinsic predation risk in genetically modified *Cyprinus carpio*: implications for environmental risk. JOURNAL OF FISH BIOLOGY 84(5), 1527-1538.

10) Moreau DTR, Gamperl AK, Fletcher GL, Fleming IA. (2014) Delayed Phenotypic Expression of Growth Hormone Transgenesis during Early Ontogeny in Atlantic Salmon (*Salmo salar*)? PLOS

ONE 9(4), e95853.

- 11) Panserat S, Kamalam BS, Fournier J, Plagnes-Juan E, Woodward K, Devlin, RH. (2014) Glucose metabolic gene expression in growth hormone transgenic coho salmon. *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY A-MOLECULAR & INTEGRATIVE PHYSIOLOGY* 170, 38-45.
- 12) Sundstrom LF, Vandersteen WE, Lohmus M, Devlin RH. (2014) Growth-enhanced coho salmon invading other salmon species populations: effects on early survival and growth. *JOURNAL OF APPLIED ECOLOGY* 51(1), 82-89.
- 13) Cnaani A, McLean E, Hallerman EM. (2014) Effects of growth hormone transgene expression and triploidy on acute stress indicators in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) . *AQUACULTURE* 420, S124-S133.
- 14) Moreau DTR, ANNUAL (2014) Ecological Risk Analysis and Genetically Modified Salmon: Management in the Face of Uncertainty. *REVIEW OF ANIMAL BIOSCIENCES, VOL 2: Annual Review of Animal Biosciences*, 515-533.
- 15) Cao, MX Chen, J Peng, W Wang, YP Liao, LJ Li, YM Trudeau, VL Zhu, ZY Hu, W . (2014) Effects of growth hormone over-expression on reproduction in the common carp *Cyprinus carpio* L.. *GENERAL AND COM-PARATIVE ENDOCRINOLOGY* 195, 47-57.
- 16) Controllable on-off method for fish reproduction.
US 2014/0331346 A1
Applicant: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan (CN)
Inventors: Wei HU, Wuhan(CN); Yunsheng ZHANG, Wuhan(CN), Jun DAI, Wuhan(CN), Zuoyan ZHU, Wuhan(CN)
Appl. No.; 14/247,145

表1. GH遺伝子組み換え魚肝臓中の網羅的遺伝子解析結果

Parameter	コントロール	導入遺伝子ホモ個体
Reads	1,654,609	1,327,349
Kind of reads Number of gene ID	207,801	166,849
<i>S. Salar</i>	6,038	6,145
<i>O. Mykiss</i>	2,341	2,387
Total	8,379	8,532

導入遺伝子ホモ個体、コントロール 肝臓（各群5検体） mRNAからcDNAライブラリーを構築し、遺伝子断片を解析

1.

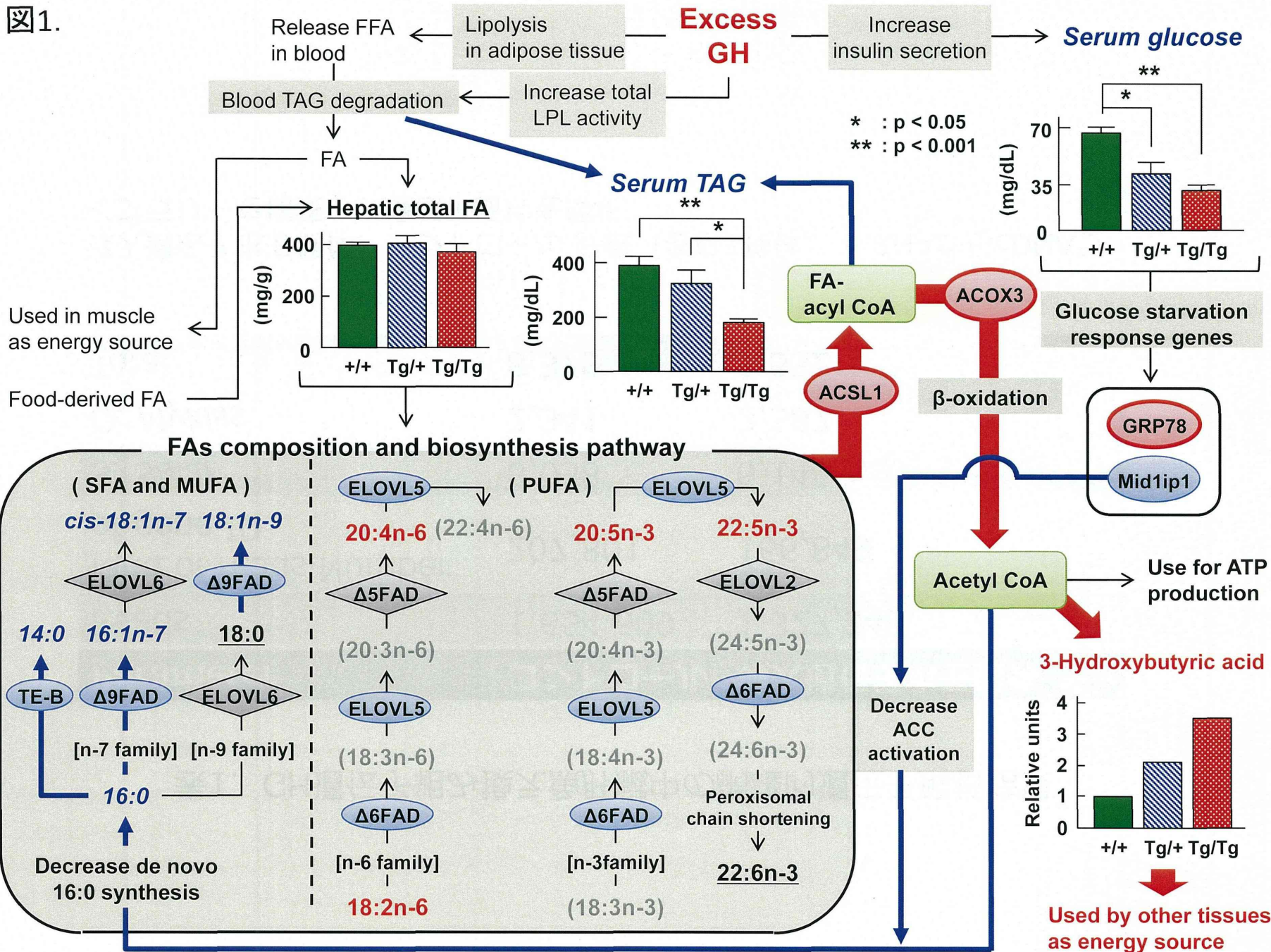







図1. 遺伝子組換えアマゴ肝臓中における代謝

	[Gene]	[Arrow]
Red: Up	 : Up-regulated	 : Up
Blue: Down	 : Down-regulated	 : Down
Gray: Not detected		
Black: No alteration	 : Not detected	

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

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。

サルモネラ鞭毛抗原を菌体表層に固定化発現した遺伝子組換え乳酸菌と、非組換え乳酸菌(宿主菌)について、網羅的オミクス解析を行い両者の違いについて検討した。オミクス解析は、プロテオーム解析(手島博士)、メタボローム解析(太田博士)、トランスクリプトーム解析(小関博士)が分担しておこなった。プロテオーム解析については、大腸菌で鞭毛抗原—アンカーを大量に作らせ、タンパク質として精製し、非組換え乳酸菌にふりかけアンカーにより菌体表層に結合させた組換え遺伝子を含まない乳酸菌についても解析し、遺伝子組換え乳酸菌、宿主菌との比較を行った。プロテオーム解析により、膜上のプロテアーゼの発現が変化していることが観察された。メタボローム解析では、GM と non-GM を区別するような明確なクラスター分離、および代謝物蓄積の相違は認められなかった。トランスクリプトーム解析では、コントロール株の一群の遺伝子の脱落が確認されたものの、それ以外には、両者の差は、トランスポゼースを除き見られなかった。

協力研究者

梶田和彌 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

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

込む遺伝子産物単独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

物単独の示す免疫影響とは異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。

平成 26 年度は、モデル乳酸菌組換え体を他の分担研究者に提供し、オミクス解析を行った。サルモネラフラジェリン抗原 (TLR5 に結合可) 細胞表面発現した乳酸菌 (GM) と、宿主菌を比較した。トランスクリプトーム解析は小関博士、プロテオーム解析は手島博士、メタボローム解析は太田博士にお願いした。

B. 研究方法

1. ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜への大腸菌、乳酸菌の接着菌数の測定

ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞のサブクローンである C2BBel 細胞を 24 穴プレートに播種後、2 週間培養し単層膜を形成させた。

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 (*Escherichia coli* JM109) および乳酸菌 (*Lactobacillus casei* IGM393)、コントロールとしてそれらの宿主菌を C2BBel 単層膜に 10^7 個添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。単層膜を洗浄後、界面活性剤により細胞を破碎、寒天培地に接種し CFU により単層膜への接着菌数をそれぞれ算出した。

2. ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜が取り込む大腸菌、乳酸菌の菌数測定

C2BBel 単層膜を調整後、各細菌を添加し 1 時間インキュベートした。単層膜を洗浄後、ゲンタマイシンを含む培地を加え、さらに 37 °C で 3 時間インキュベートし細胞外に残る細菌を取り除いた。単層膜を洗浄後、界面活性剤により細胞を破碎、寒天培地に接種し細胞が内部に取り込んだ菌数を CFU により算出した。

3. ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜の組換え大腸菌の取り込みに対する抗 Invasin 抗体の影響の検討

Invasin を発現する組換え大腸菌に、異なる濃度の抗 Invasin 抗体を添加し、室温で 30 分インキュベートした。

C2BBel 単層膜に調整した菌を抗体と共に添加し、前述の方法と同様に細胞内に取り込まれた菌数を CFU により算出した。

4. エンドサイトーシス阻害剤による組換え大腸菌の取り込み経路の検討

C2BBel 単層膜にエンドサイトーシス阻害剤であるクロルプロマジン、メチルベータシクロデキストリン、ナイスタチンをそれぞれ添加し、37 °C

で 20 分間インキュベートした。

前述の方法と同様に C2BBel 単層膜に調整した菌を添加、細胞内に取り込まれた菌数を CFU により算出し、エンドサイトーシス阻害剤の影響を検討した。

5. 海外の腸内細菌叢と遺伝子組換え微生物研究に関する情報収集

フランスのクレルモン=フェラン市で開催された INRA-Rowett Institute の腸内細菌叢に関する国際シンポジウムに参加して、腸内細菌叢に関する最新の研究成果並びに腸内細菌叢を介した安全性に関する研究動向について情報収集並びに情報交換を行った。

6. ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜への *spiB* 遺伝子の導入

実験の概要は、図 4 に示した。

①使用細胞及び培養条件

ヒト結腸癌由来の C2BBel 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。

ヒトバ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 RPMI1640 (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

C2BBel 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' -aaaactcgagatgctcgcctggaggctgc と 5' -ggaagatcttcaggcccgcgactgcag 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 C2BBel 細胞への Tet-On 調節ベクターの導入

C2BBel 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は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

トランスフェクションを行った。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。

7. オミクス解析

①オミクス解析に用いた乳酸菌

1) 菌の種類：

a) サルモネラフラジェリン抗原(TLR5 に結合可)細胞表面発現乳酸菌(GM)

b) 野生型乳酸菌(non-GM)

2) 菌の保存：

乳酸菌を培養し遠心にて回収、PBS で洗浄後に菌体を液体窒素で急速凍結、-80°Cに保管。それぞれのオミクス解析に湿重量 1g を調整。(1g 湿重量あたりのタンパク質含量 10 数%, RNA 含量 1-2mg)

3) 解析方法：

a) プロテオーム—2D-DIGE (LC-MS/MS) (手島)2D-DIGE 並びにショットガン LC-MS によるプロテオーム解析及びアレルゲノーム解析を行った。分析方法等は、手島博士分担報告書を参照。

b) メタボローム---LC-MS, GC-MS etc. (太田) 乳酸菌のメタボローム解析には、集菌後クエンチ溶液として、0.85%(w/v)炭酸アンモニウムを含む 60%メタノール溶液を用いた。分析方法等は、太田博士分担報告書参照。

c) トランスクリプトーム—DNA tip (小関) 乳酸菌のトランスクリプトーム解析には適したアレイチップを用意できなかったため次世代シーケンサーによる mRNA 網羅的解析 (RNA-seq) によって組換え体とベクターコントロールでの遺伝子発現解析を行った。解析は、rRNA 枯渇処理の後、次世代シーケンサー HiSeq2000 によって 2000 万リードでユーロフィン社に委託した。小関博士分担報告書参照。

②プロテオーム解析用追加試料

1) 菌の種類：

c) 1-a) GM 乳酸菌の比較対象として、フラジェリン抗原を菌株表面固定化された組換えにならない乳酸菌を使用：具体的には、大腸菌にフラジェリン抗原—アンカーを大量に作らせ、タンパク質として精製し、精製タンパク質を non-GM 乳酸菌死菌に混ぜて、アンカーにより菌体表面に結合させて作成した。

解析方法：a),b),c) 3 種の乳酸菌のたんぱく質発現の差を 2D-DIGE で解析した。

C. 研究結果

1. ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜への組換え大腸菌、乳酸菌の接着菌数

C2BBel 単層膜を用いて組換え大腸菌および乳酸菌の接着菌数を測定した。大腸菌の場合、Invasin 発現株では非発現株に比べ約 2 倍の接着菌数の増加が確認された。一方、乳酸菌では Invasin 発現株と非発現株の接着菌数に有意な差は確認されなかった。

2. ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜が取り込んだ大腸菌、乳酸菌の菌数

C2BBel 単層膜による各細菌の取り込み菌数の比較を行った。大腸菌の場合、非組換え株では細胞内部への取り込みは確認できなかった。一方、Ivasin 発現株では細胞内部へ取り込まれた菌数はおおよそ 10^2 個であった。乳酸菌の場合、組換え、非組換えいずれも細胞内部への取り込みが確認できたが、取り込まれた菌数に有意な差は見られなかった。

3. 抗 Invasin 抗体処理が C2BBel 単層膜の組換え大腸菌の取り込みに及ぼす影響

Invasin 発現大腸菌に抗 Invasin 抗体を添加し、細胞による取り込みに対する Invasin の影響を検討した。

C2BBel 単層膜が取り込んだ組換え大腸菌の菌

数は、抗体濃度依存的に減少した。

4. C2BBe1 細胞が組換え大腸菌を取り込む経路の検討

各種エンドサイトーシス阻害剤で処理を行った C2BBe1 単層膜に組換え大腸菌を加え、取り込み菌数の減少を指標に取り込み経路の検討を行った。

ナスタチンを添加した単層膜では、エンドサイトーシス阻害剤を添加しないコントロール単層膜に比べ約 3 割の取り込み菌数の減少が確認された。また、クロルプロマジン添加をした場合、コントロールに比べおよそ 9 割の取り込み菌数の減少が確認された。

5. 海外の腸内細菌叢と遺伝子組換え微生物研究に関する情報収集

フランスのクレルモン=フェラン市で開催された INRA-Rowett Institute の腸内細菌叢に関する国際シンポジウムでは、腸内細菌叢がヒトの健康に多大な影響を与えることを示す最新の研究が多数報告されていた。細胞レベルの研究から、ヒトにおける健康への影響に関する多様な研究成果が発表されていた。

6. 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。

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。

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。

7. オミクス解析

(1) プロテオーム解析

2D-DIGE による、a) GM、b) non-GM の比較では、菌体の処理を行った a) に対して b) が、1.5 倍以上減少したスポットが 6 スポット、同増加したスポットは 6 スポットであった。培養上清では、同減少が 11 スポット、同増加が 4 スポットであった。GM で増加した菌体抽出から 3 スポット、non-GM で増加したスポット 1 について、培養上清では GM で増加したスポット 2 つを選び、MS 解析を行い、タンパク質の同定を試みた。挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、GM で増加の見られ、重要と思われたタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された。詳しくは手島博士の分担報告書参照。

(2) メタボローム解析

生菌数及び細胞ペレット湿重量の菌株間の比較では、サルモネラ鞭毛発現株 (GM) は、非発現株 (non-GM) よりも増殖が遅いことが推定された。GM 株と non-GM 株で、GC-MS 分析で、それぞれ 289

個、235 個の代謝物ピークを特定した。極性画分の誘導体化試料では 69 個（同定率 23.9%）、非極性画分の誘導体化試料では 52 個（同定率 23.1%）の代謝物ピークを同定した。

GM と non-GM を区別するような明確なクラスター分離、および代謝物蓄積の相違は認められなかった。尚、詳しいデータは、太田博士分担報告書を参照。

(3) トランスクリプトーム解析

次世代シーケンスの結果、タンパク質をコードしている 2,997 遺伝子の配列を獲得し、この獲得配列の 8 割程度を今回使用した IGM393 株と同系統の *Lactobacillus casei* BL23 株のゲノム配列にマッピングすることができた。*L. casei* BL23 は 3,044 種のタンパク質をコードする遺伝子の存在が報告されていることから今回の次世代シーケンスの結果はほぼ全ての遺伝子の配列を網羅できた結果となった。ベクターコントロールとの遺伝子発現量を比較した結果、フラジェリン遺伝子組換え体では 20 種類の遺伝子で発現が上昇していることが示された。特にゲノム領域の LCABL_03590 ~ 03730 の遺伝子の発現がフラジェリン遺伝子組換え体において特異的であることが示された。また、トランスポゼースをコードする 1 遺伝子のみがフラジェリン遺伝子組換え体で発現が低下していた。

D. 考察

○ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜への組換え大腸菌、乳酸菌の評価について

Caco-2 細胞のサブクローンである C2BBel 細胞の単層膜を用いて、エルシニアの侵入因子である Invasin を発現する大腸菌、および乳酸菌組換え体を作成し、それらの機能評価を行った。この実験では、ヒト腸管上皮由来である C2BBel 細胞の

もつ M 細胞様活性を利用し、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。

C2BBel 単層膜への接着菌数、単層膜による取り込み菌数は大腸菌と乳酸菌では異なる結果となった。大腸菌では Invasin 発現の影響が見られ、Invasin を発現する大腸菌は接着菌数が有意に増加した。また、単層膜内に取り込まれた菌数は、非組換え大腸菌が取り込まれていないのに対し、Invasin 発現大腸菌では顕著な取り込み菌数の増加が見られた。一方、乳酸菌では接着菌数、取り込み菌数共に Invasin の発現の有無による差が見られなかった。乳酸菌は大腸菌と細胞表面の構造が大きく異なることから、挿入遺伝子産物である Invasin の発現方法や乳酸菌が発現する Invasin の活性を含め今後の検討が必要ではあるが、グラム陽性菌の乳酸菌 *L. casei* とグラム陰性菌である大腸菌にそれぞれ同一の遺伝子を挿入したところ、それぞれの組換え体の細胞への取り込みに関して異なる結果が得られたことは非常に興味深い。

C2BBel 単層膜を用いた場合、大腸菌では Invasin の発現による細胞内部への取り込みに影響が見られたことから、次にその取り込み機構の検討を行った。まず、Invasin 発現大腸菌の取り込み菌数の増加が Invasin に依存するかを確認するため、抗 Invasin 抗体を用いた阻害実験を行った。その結果、Invasin 抗体の濃度の上昇に伴い、単層膜内部へ取り込まれる菌数が減少した。このことから単層膜内部への取り込み菌数の増加は遺伝子組換えにより発現させた Invasin 依存的事であることが示唆された。

C2BBel 単層膜による組換え大腸菌の取り込み菌数の増加に遺伝子組換えにより発現させた Invasin の影響が確認されたことから、次にその

取り込み経路の検討を行った。本研究では特に飲作用を中心に、クラスリンあるいはカベオリンを介したエンドサイトーシス、およびマクロピノサイトーシスを評価した。

カベオリン依存的エンドサイトーシス阻害剤であるメチルベータシクロデキストリン添加群では組換え大腸菌の取り込み菌数の減少は見られなかった。マクロピノサイトーシス阻害剤であるナイスタチン添加群では、阻害剤非添加群に比べ3割程の取り込み菌数の減少が確認された。そのため組換え大腸菌の一部はマクロピノサイトーシスにより細胞内部へ取り込まれていることが予想された。

クラスリン依存的エンドサイトーシス阻害剤であるクロルプロマジンは取り込み菌数への影響が最も大きく、阻害剤非添加群に比べ約9割の取り込み菌数の減少が確認された。Invasin を発現する組換え大腸菌を C2BBel 細胞が内部へ取り込む経路はクラスリンを介した機構が主であることが示唆された。

以上のことからエルシニアの侵入因子である Invasin は、C2BBel 単層膜のクラスリン依存的エンドサイトーシスを促進し、取り込み菌数を増加させる機能を大腸菌に付与することが示唆された。乳酸菌に発現させた Invasin では、細胞への取り込みに影響を与えず、何故か大腸菌組換え体で示された取り込みメカニズムが働いていない。宿主により同一の抗原が異なった結果を示す理由については不明であり、更なる検討が必要と思われる。

また、今回の結果から、Invasin を発現する組換え大腸菌の機能評価に C2BBel 単層膜の利用が有用であることが示された。今回の実験により、C2BBel 細胞が Invasin を発現する組換え大腸菌を内部へ取り込む経路はクラスリンを介した機構

が主であるが、このメカニズムは動物やヒト腸管 M 細胞で実際に起こっているかどうかについては、今後更なる検討を行う必要があると思われる。

○海外の情報収集について

フランスのクレルモン=フェラン市で開催された INRA-Rowett Institute の腸内細菌叢に関する国際シンポジウムに参加し、遺伝子組換え微生物に関する情報収集を行った。サイトカイン IL-10 を産生する乳酸菌が、マウスの実験や慢性腸疾患のヒトへの治験で劇的な治療効果を示したにもかかわらず、実用化に関してはなかなか進展していない状況について情報収集を行った。ヨーロッパでも遺伝子組換え微生物を生きのまま利用することについてはコンセンサスが得られておらず、今後の方針は未だはっきりしていないようである。生きのままの遺伝子組換え微生物の利用に関しては、環境への放出の問題が最も懸念されているようである。

○ヒト腸管モデル細胞 C2BBel 単層膜への spiB 遺伝子の導入による評価系の開発について

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、C2BBel 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C2BBel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。

○オミクス解析について

(1) プロテオーム解析

挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、GMでnon-GMと比べ増加が見られ、重要と思われたタンパク質として、細胞壁の分解酵素が確認された。この事実は、以前この乳酸菌モデル組換え体を培養細胞で評価したところ、GMはnon-GMに比べ細胞からのTNF誘導活性が低下しており、その理由として細胞壁のプロテアーゼに対する抵抗性が低下しているという知見との関連が示唆された。GMでは、異種由来のタンパク質であるサルモネラの鞭毛抗原の発現により、その対応として細胞壁の融解酵素を誘導しているもの

と思われる。

(2) メタボローム解析

GMとnon-GMでは、増殖性がやや異なっていた。代謝物蓄積量を定量的に比較したが、遺伝子組換えが原因であると判定すべき代謝物プロファイルの差は認められなかった。

(3) トランスクリプトーム解析

フラジェリン遺伝子導入乳酸菌では、フラジェリン遺伝子組換え体の株において特徴的にゲノムの特定の領域の遺伝子に発現が見られた。使用したベクターコントロール株において組換え時または培養変異などの要因によりこのゲノム領域が欠落している可能性が考えられた。この領域以外の遺伝子で顕著に発現が変動しているものは確認されなかった。

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。今回の細胞を用いた評価系が示した結果は、動物やヒトのM細胞でも実際に同様に起こっているかは大変興味深く、今後更なる検討が必要と思われる。

フランスのクレルモン=フェラン市で開催されたINRA-Rowett Instituteの腸内細菌叢に関する国際シンポジウムに参加して、現在ヨーロッパではこの分野の研究が非常に熱心に行われており、腸内細菌叢が人への健康に強く関わっているこ

とが分子レベルで明らかにされていた。遺伝子組換え微生物の利用については、環境放出の問題が最も重要であると捉えられているようである。

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 C2BBel 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 C2BBel 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。

フラジェリン遺伝子導入乳酸菌のプロテオーム解析では、GM で、挿入遺伝子産物であるサルモネラの鞭毛抗原以外で、細胞壁の分解酵素の増加が確認された。メタボローム解析では、代謝物蓄積量を定量的に比較したが、遺伝子組換えが原因であると判定すべき代謝物プロファイルの差は認められなかった。トランスクリプトーム解析ではコントロール株の一群の遺伝子の脱落が確認されたものの、それ以外には、両者の差は、見られなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

梶川揚申、五十君静信。乳酸菌組換えワクチン。書籍：新しい乳酸菌の機能と応用。シーエムシー出版

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

森田英利、Tulika Srivastava、中野章代、高畑宗明、高木孝士、西山英利、藤 英博、大島健志朗、Todd D. Taylor、五十君静信、服部正平。 *Lactobacillus* 属と *Bifidobacterium* 属における線毛および鞭毛の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察。日本乳酸菌学会。2012.7.12-13。

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

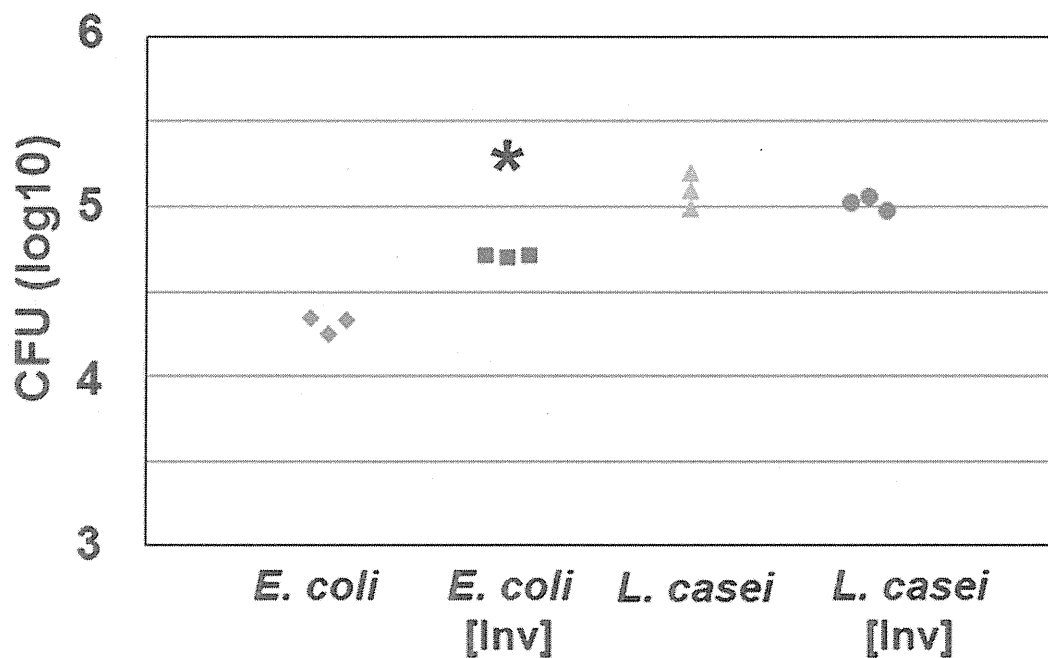


図1 C2BBel 単層膜への接着菌数

約2週間24穴プレートで培養したC2BBel単層膜に各細菌を 10^7 個添加し、37℃で1時間インキュベートした際の接着菌数をCFUにより算出した。(* $p < 0.01$)

◆は非組換え *Escherichia coli* JM109、■は Invasin を発現する組換え大腸菌、▲は非組換え *Lactobacillus casei* IGM393、●は Invasin 発現組換え乳酸菌。

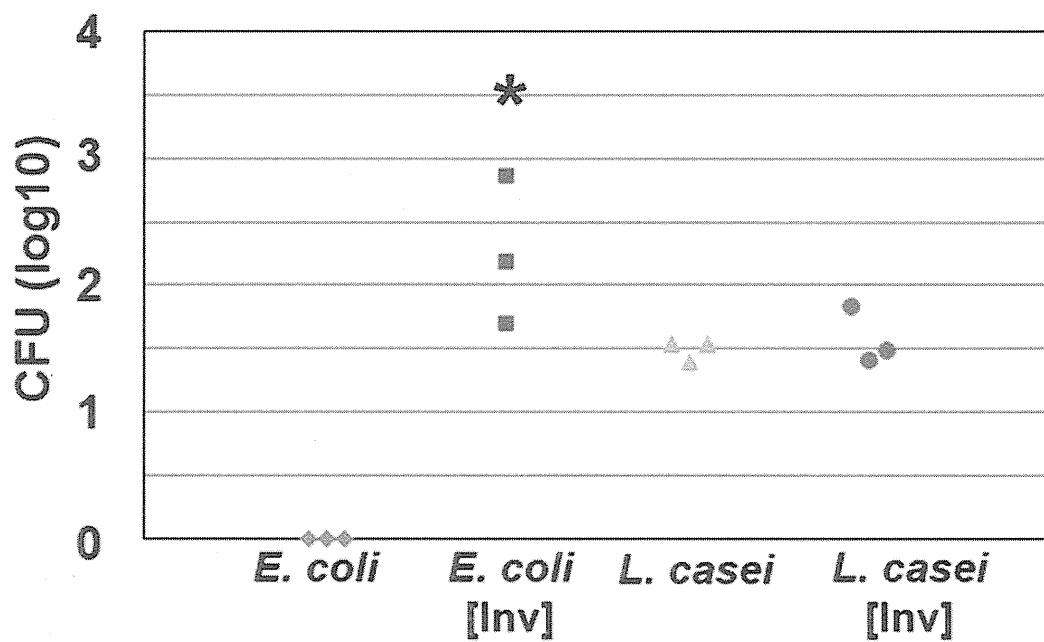


図2 C2BBe1 単層膜による取り込み菌数

約2週間24穴プレートで培養したC2BBe1単層膜に各細菌を 10^7 個添加し、37℃で1時間インキュベート後、ゲンタマイシンを添加し細胞外に残る細菌を取り除き、細胞内に取り込まれた菌数をCFUにより算出した。(* $p < 0.01$)

◆は非組換え大腸菌、■は Invasin を発現大腸菌、▲は非組換え乳酸菌、●は Invasin 発現乳酸菌。

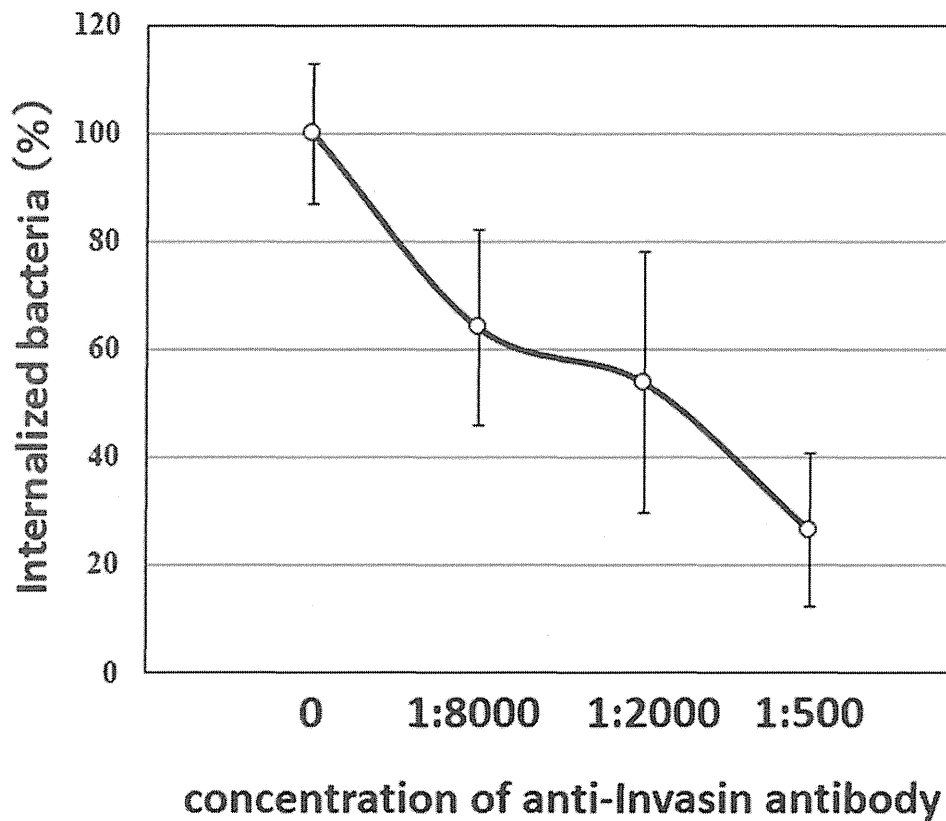


図3 Invasin 発現大腸菌の取り込み菌数に対する抗 Invasin 抗体の影響

Invasin 発現大腸菌を濃度の異なる抗 Invasin 抗体と共にインキュベート後、C2BBel 単層膜に添加し取り込まれた菌数を CFU により求めた。抗体未添加時に Invasin 発現大腸菌が細胞内に取り込まれた菌数をコントロールとし、抗体添加時に取り込まれた菌数をコントロールに対する割合で示した。抗体濃度の増加に伴い細胞内に取り込まれる菌数は減少した。

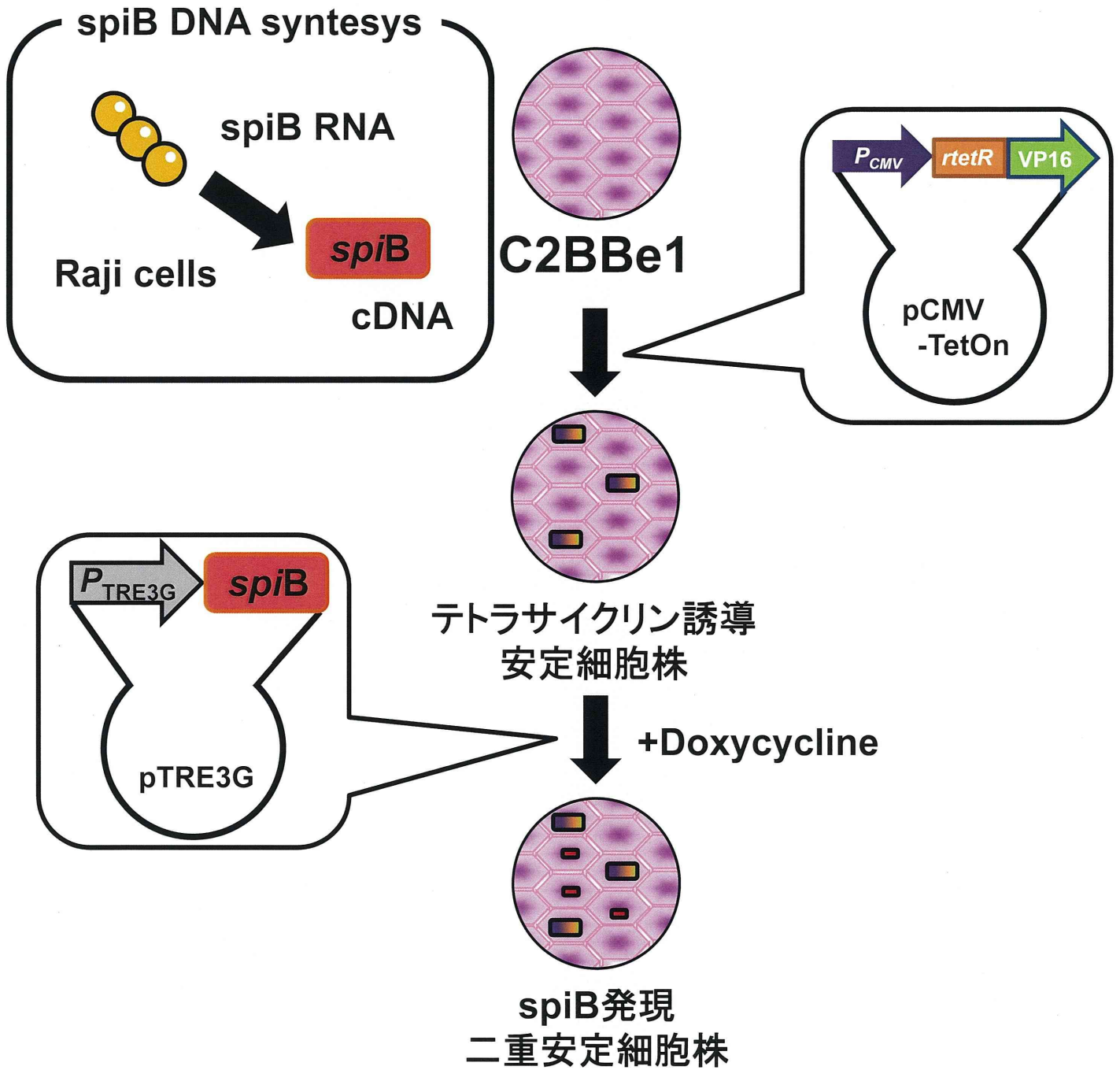


図4. 実験工程概要模式図