

## バイオテクノロジー応用微生物の安全性

研究分担者 五十君 静信 東京農業大学 教授

### 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。

平成27年度までに、モデル乳酸菌組換え体に関するオミクス(トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム)による網羅的の解析が終了したので、平成28年度は遺伝子組換え微生物の安全性評価に用いる為の組換え体とヒト腸管上皮細胞の相互作用に関する評価手法について検討を行った。

エルシニアの表層抗原を乳酸菌表層に固定発現したモデル組換え体を作出し、ヒト腸管上皮細胞である Caco-2 細胞の派生クローンである C2BBel 細胞との相互作用について評価を試みた。培地、宿主乳酸菌、組換え乳酸菌の3者を細胞と反応させた後、

### 協力研究者

梶田 和彌 東京農業大学  
梶川 揚申 東京農業大学  
武田 昌之 東京農業大学  
関根 侑 東京農業大学

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。

先行する研究成果により、サルモネラ鞭毛抗原を菌体表層に固定化発現したモデル乳酸菌組換え体に対しオミクス解析を行い、組換え体と非組換え体の網羅的な比較を行った。その結果が、元株と GM 株のゲノムの一部が欠損しているのではないかという知見が得られてため、全ゲノム解析により比較検討を行い、遺伝子の状況を評価することにした。本年度は、モデル

### A. 研究目的

モデル組換え体を作出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

乳酸菌の作成及び、遺伝子組換え微生物の安全性評価に用いる為の組換え乳酸菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価手法について検討を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### (1) 遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出

エルシニアの表層抗原 Invasin を菌体表層に固定化発現させた乳酸菌を作出しモデル組換え体とした。乳酸菌は、*Lactobacillus casei* 394 を用いた。また、ノサシバエ由来の遺伝子を用いたランダムミュレーション法によりエリスロマイシン耐性を付与した同菌変異株を 100 株、作成した。

### (2) 細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価

ヒト腸管上皮細胞モデルとして Caco-2 細胞の派生クローンである C2BBel 細胞を用いた。情報にしたがい培養・継代し、以下の実験に用いた。C2BBel 細胞を培養・継代し、MOI: 100 となるように宿主乳酸菌、エルシニア抗原発現モデル組換え乳酸菌を接種し、37°C で 1 時間培養後、細胞から全 RNA を回収し、細胞のメッセンジャーRNA を次世代シーケンサー網羅的に解析した。培地コントロールに対し乳酸菌親株、組換え乳酸菌とヒト腸管上皮細胞の相互作用をトランスクリプトーム解析の手法にて評価した。

## C. 研究結果

### (1) 遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出

エルシニア表層抗原 Invasin を乳酸菌菌体表層に固定化発現させた組換え体を作成し、組換え乳酸菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用を評価するモデル組換え体とした。

乳酸菌 *L. casei* 394 株は、通常のランダムミュレーション法で変異株を作成すると、ゲノムのレアレンジメントをおこし、導入遺伝子を単純

に挿入した変異株を作成することが困難であるため、新規のノサシバエ由来の遺伝子によるランダムミュレーション法を確立し、エリスロマイシン耐性を付与した変異株を 100 株ほど作成した。得られた変異株を遺伝子レベルで評価したところ、ゲノム乗れアレンジメントらしき現象は観察されず、エリスロマイシン耐性遺伝子が挿入されていた。

### (2) 細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価 (トランスクリプトーム解析)

培地コントロール、宿主乳酸菌、モデル乳酸菌組換え体をヒト腸管由来細胞に 1 時間暴露させた後、細胞のメッセンジャーRNA について回収し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行った。シーケンス結果の概要(表 1)、マッピング統計データ(表 2)は、表の通りであった。

解析結果を、図 1, 図 2 に示した。図及び表の表記は、N: 培地、C: 宿主乳酸菌、IP: モデル組換え乳酸菌を示している。Log<sub>2</sub> FC を、1.6 とした場合、培地コントロールに比べ、宿主乳酸菌では 53 遺伝子の発現が、モデル組換え乳酸菌では 94 遺伝子の発現が 3 倍以上に上昇していることがわかった。

## D. 考察

### (1) 遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出

エルシニア表層抗原 Invasin を乳酸菌菌体表層に固定化発現させた組換え乳酸菌では、乳酸菌菌体表層に固定化して発現している *invasin* が、ヒト腸管上皮細胞とどのような相互作用を示すのかが興味深い。エルシニアの当該抗原はヒト腸管細胞 M 細胞の腸管腔側に発現する  $\beta$ 1-integrin と相互作用することが知られている。モデル組換え

乳酸菌に、この抗原が加わることで、ヒト腸管上皮細胞との相互作用がどのように反応するのかについて評価するためにモデル組換え体の作成を行った。

乳酸菌 *L. casei* 394 株は、通常のランダムミューテーション法で変異株を作成すると、ゲノムのレアレンジメントをおこし、導入遺伝子を単純に挿入した変異株を作成することが困難であった。そこで、新規のランダムミューテーション法として、ノサシバエ由来の遺伝子によるランダムミューテーション法の確立を試みた。エリスロマイシン耐性を付与した変異株を 100 株ほど作成し、得られた変異株を遺伝子レベルで評価したところ、ゲノムのレアレンジメントらしき現象は観察されず、エリスロマイシン耐性遺伝子が単純に挿入されていることが確認された。これらの変異株は、今後の検討のモデル乳酸菌組換え体として用いることが可能と思われる。

## (2) 細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価 (トランスクリプトーム解析)

培地コントロール、宿主乳酸菌、モデル乳酸菌組換え体をヒト腸管由来細胞に 37°C 1 時間暴露させた後、細胞のメッセンジャーRNA について回収し、次世代シーケンサーを用いて網羅的な解析を行った。培地コントロールに比べ、宿主乳酸菌では 53 遺伝子の発現が、モデル組換え乳酸菌では 94 遺伝子の発現が 3 倍以上に上昇していることから、エルシニアの抗原が乳酸菌に加わることにより、およそ 40 の遺伝子が有意にその発現が増強していることが示された。現在変化したそれぞれの遺伝子について解析を進めている。

## E. 結論

遺伝子組換えモデル乳酸菌の作出では、エルシ

ニアの表層抗原 Invasin を菌体表層に固定化発現させた乳酸菌を作出しモデル組換え体とした。また、ノサシバエ由来の遺伝子を用いたランダムミューテーション法によりエリスロマイシン耐性を付与した乳酸菌変異株 100 株を作成し、今後モデル組換え体として用いる菌株の準備が整った。

細菌とヒト腸管上皮細胞との相互作用の評価系の開発では、ヒト腸管上皮細胞モデルとして Caco-2 細胞の派生クローンである C2BBel 細胞を用いた評価系を検討した。培地コントロールに対し乳酸菌親株、組換え乳酸菌とヒト腸管上皮細胞の相互作用をトランスクリプトーム解析の手法にて評価したところ、親株に比べモデル組換え体で、約 40 の遺伝子が有意に発現を増強していることが確認された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kajikawa A, Midorikawa E, Masuda K, Kondo K, Irisawa T, Igimi S, Okada S. Characterization of flagellins isolated from a highly motile strain of *Lactobacillus agilis*. *BMC Microbiol.* 2016 Mar 22;16:49.

### 2. 学会発表

- ① 檜木真吾、永井貴久、佐々木泰子、五十君静信。  
抗がん剤の宿主として利用するための酸素感受性 *Lactobacillus casei* IGM394 の作出。日本乳酸菌学会。2016.7.9-10。北里大学白金。
- ② 関根 侑、野口 実莉、石浜 峻、榎田 和彌、梶川 揚申、横田 健治、五十君 静信。  
*Lactobacillus casei* が有する免疫誘導分子の探索系の

構築。日本農芸化学会 2017 年度大会。2017.3.18-20。  
京都

- ③藤原公紀、横田健治、五十君静信、梶川揚申。  
遺伝子検出法を用いた動物腸管由来運動性  
*Lactobacillus* 属細菌の検索。日本農芸化学会 2017  
年度大会。2017.3.18-20。京都
- ④近藤和穂、横田健治、五十君静信、梶川揚申。  
*Lactobacillus agilis* BKN88 における走化性の解析。  
日本農芸化学会 2017 年度大会。2017.3.18-20。京  
都
- ⑤辻光倭、鈴木俊也、横田健治、五十君静信、梶  
川揚申。IL-1 ファミリーサイトカイン分泌乳酸菌  
の構築と評価。日本農芸化学会 2017 年度大会。  
2017.3.18-20。京都
- ⑥五日市悠、柴崎泰基、横田健治、五十君静信、  
梶川揚申。酢酸菌の免疫刺激作用に関与する菌体  
構成成分の探索。日本農芸化学会 2017 年度大会。  
2017.3.18-20。京都
- ⑦鈴木俊也、横田健治、五十君静信、梶川揚申。  
乳酸菌由来 S-layer タンパク質の免疫学的特性。  
日本農芸化学会 2017 年度大会。2017.3.18-20。京  
都

### 3. その他発表

表 1 シーケンス結果の概要

## General Information

Se-

q

u

e

n

c

e

## Sequencing Results

Sample	Index	Reads	Called Bases (Mbp)	%Q30	Average Quality
N_1	ACTTGA	18,238,430	2,280	93.35	35.27
N_2	GATCAG	12,307,624	1,538	93.91	35.42
IP_1	TAGCTT	12,719,520	1,590	94.40	35.57
IP_2	GGCTAC	13,916,792	1,740	92.76	35.07
C_1	CTTGTA	12,942,068	1,618	91.80	34.74
C_2	AGTCAA	13,984,238	1,748	93.41	35.26

x

1

2

5

l

n

s

t

r

u

m

e

n

t

:

u

表 2. マッピング統計データ

<b>Mapping Overview</b>					
<b>Sample</b>	<b>Total Reads</b>	<b>Cleaned Reads</b>	<b>Reads Mapped</b>	<b>Reads Unmapped</b>	<b>Mapping Rate</b>
	(M)	(M)	(M)	(M)	(%)
N_1	18.2	15.2	12.7	2.4	84.05
N_2	12.3	9.8	8.3	1.5	84.66
IP_1	12.7	10.4	8.6	1.8	82.40
IP_2	13.9	10.8	9.3	1.5	86.46
C_1	12.9	9.5	8.1	1.4	84.98
C_2	14.0	11.1	9.5	1.7	84.99

<b>Reference Bases Covered</b>				
<b>Sample</b>	<b>1x Depth</b>	<b>10x Depth</b>	<b>30x Depth</b>	<b>50x Depth</b>
N_1	47.27%	14.06%	4.46%	2.36%
N_2	41.45%	9.80%	2.72%	1.35%
IP_1	40.90%	9.58%	2.68%	1.36%
IP_2	43.28%	10.77%	3.11%	1.61%
C_1	40.31%	9.14%	2.55%	1.29%
C_2	43.47%	11.05%	3.18%	1.62%

図 1. 正確検定による結果

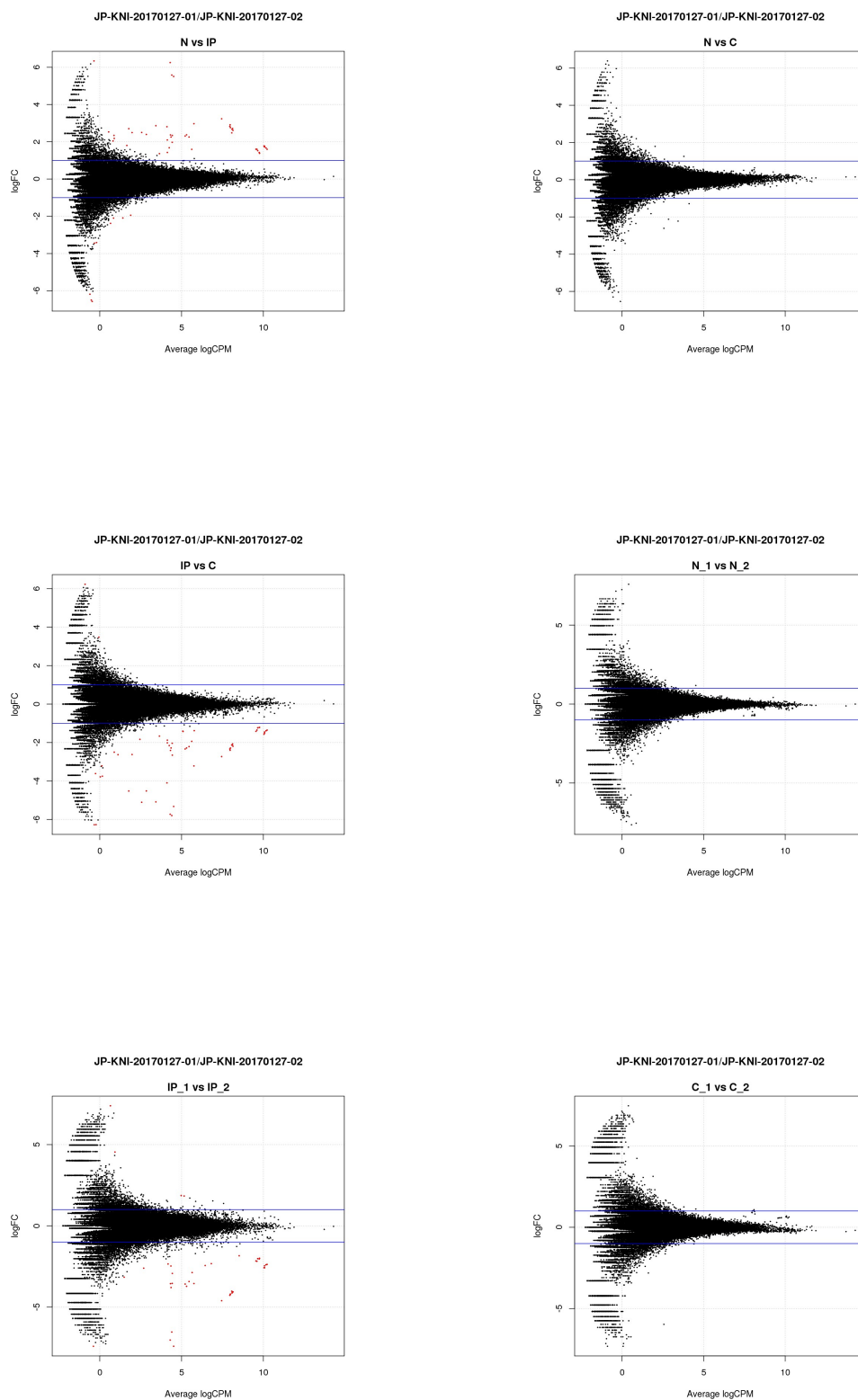


図 1. 正確検定による結果

図2. 尤度比検定による結果

