

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試みる。

平成27年度に、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年度から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成し、ヒト腸管上皮細胞のモデル評価系に頻りに用いられるCaco-2細胞との反応性を検討した。Caco-2細胞の派生クローンであるC2BBel細胞にモデル乳酸菌組換え体を加えたときの細胞の応答に関して評価を試みた。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、C2BBel細胞から全RNAを抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。宿主乳酸菌と組換え乳酸菌を細胞にさらした結果を比較したところ、エルシニアの表層抗原の発現により、ヒト腸管上皮細胞モデルでは、転写レベルでおよそ40遺伝子の発現が有意に上昇していることが示された。また、組換えによりエルシニア抗原を発現させると、乳酸菌の上皮細胞へ取り込みが増大した。細胞のトランスクリプトーム解析の結果から、組換え乳酸菌に曝されたヒト腸管上皮細胞内では分子レベルでどのような影響が起こっているかについて観察することができ、今後このような手法を用いることにより、組換え微生物がヒト腸管上皮細胞にどのような影響を与えるかの評価が可能であり、安全性評価に活用が期待される。

協力研究者

梶田 和彌 昭和女子大学
梶川 揚申 東京農業大学
檜木 真吾 東京農業大学
武田 昌之 東京農業大学
若山 水歩 東京農業大学

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明らかとなっている。組換え微生物では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ことを示すことができた。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。また用いた組換え体と元株のゲノム解析の結果、組換え体においてゲノムの一部が欠損しているという知見が得られた。

平成 27 年度に、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）による網羅的な比較解析が終了したので、平成 28 年度から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。

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、平成 28 年度に引き続き、ノサシバエ由来の遺伝子を用いたランダムミュート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を約 300 株、追加で作出し、得られた変異株の表現型について検討を行った。

(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 C2BBE1 細胞を用いた。定法にしたがい培養・継代し、以下の実験に用いた。C2BBE1 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 を回収した後、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。培地コントロールに対し乳酸菌親株、組換え乳酸菌をヒト腸管上皮細胞に暴露させた場合の影響について、腸管上皮細胞の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（図 1）。

乳酸菌 *L. casei* 394 株は、通常のランダムミュートーション法で変異株を作成すると、ゲノムのリ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ート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新たに約 300 株作出した。新しい手法によるランダムミュートーション法により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独で挿入されていた。得られた変異株の免疫への刺激活性は、親株に比べほぼ同等な株、2 分の 1 以下に明らかに低下した株等が得られた。以前のランダムミュートーションにおいては、変異株に免疫増強性が観察されたがこのような増強株は観察されなかった。

(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 C2BBe1 細胞に 1 時間暴露させた後、元株 (LCN) 組換え乳酸菌 (LCI497) がそれぞれ C2BBe1 細胞と接着、取り込みを起すかを評価したところ、図 2 に示すように、組換えにより接着、取り込み菌数共に増大した。

C2BBe1 細胞からトータル RNA を回収し、メッセージ RNA について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、マッピング統計データは、平成 28 年度の報告書に示した。トランスクリプト毎のリード数は、図 3 に示した。

尤度比検定による発現量差の検定結果 MA プロットの結果は、図 4 に示した。プロットヒートマップおよび各遺伝子発現量の解析結果は図 5 に示した。図 6 には PCR 産物の融解曲線を示した。これにより副産物がないことを確認した。図 7 には、PCR 産物の増殖曲線を示した。これにより評価系には DNA の混入がないことを確認した。Log₂ 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。

トランスクリプトーム解析の結果から、元株と遺伝子組換え株で遺伝子の発現の増強の観察された遺伝子の中から、その機能が推定可能な 4 種類の遺伝子 (*NFKB1A*, *CXCL8*, *CXCL1*, *CCL20*) に着目して、qPCR による相対定量による遺伝子発現量の比較を行った結果を図 8 に示した。

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 β 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、この抗原を菌体表層に固定化し発現させることにより、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。図 1 で確認されたように、エルシニア表層抗原 Invasin は乳酸菌で良好に発現し、菌体表層に安定的に固定化されていることが確認された。これをモデル組換え体としてヒト腸管上皮細胞との相互作用を検討することは、今後の組換え微生物と腸管上皮細胞との間でどのようなやりとりが行われているかを明らかにすることが可能であり、安全性評価の評価系として大変有効な手法と思われる。

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 300 株ほど追加作成し、得られた変異株を遺伝子レベルで評価したところ、以前観察された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、免疫活性を評価したところ、元株に対してほぼ同等か、明らかな低下を示した。これらの変異株は今後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4℃あるいは37℃1時間暴露させた後、C2BBel細胞への接着、取り込みを評価した。図2に示されるように、元株に比べ組換え体は、接着、取り込み共に増大した。組換え体に発現させている *Yersinia* 由来の Invasin は、 β 1-integrin 受容体との相互作用を介して細胞への接着および侵入に関与することが報告されている。通常、M細胞を除く腸管上皮細胞において β 1-integrinは基底膜側のみに局在している。しかし、本実験において乳酸菌の接着効率および取り込み効率が Invasin の発現により向上したことから、この結果には β 1-integrinと Invasin の相互作用が関与している可能性が高いと考えられる。過去の研究では、MDCK-1細胞(イヌ腎臓尿管上皮細胞由来)や、Caco-2細胞を用いた *in vitro* の試験において、*Y. pseudotuberculosis* の Invasin が細胞表面に接着することで β 1-integrinの局在が基底膜側から管腔側に変化し、*Y. pseudotuberculosis* の取り込みに関与することが報告されている。このことから、本実験においても乳酸菌に発現させた Invasin によって同様の現象が起こった可能性が示唆された。

C2BBel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。コントロール群と比較して発現量が約3倍以上変動した67個の遺伝子のうち、元株添加群と、組換え体添加群との間で

発現量に顕著な差が見られた遺伝子は、*TNFAIP3*, *NFKBIA*, *BIRC3*, *FNDC9*, *CXCL8*, *LOC102723727*, *TRHDE*, *CXCL3*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CCL20*, *PSMB9*, *TSPAN11*, *C18orf63*, *PLA2G2F*, *OR7A5*であった。図5に示した主な遺伝子に関するヒートマップで、乳酸菌元株による細胞への影響、また、エルシニアの抗原が乳酸菌に加わることにより起こる反応が示された。

CXCL1, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL8*, *CCL20*は、免疫反応において樹状細胞やT細胞、B細胞などの誘因物質として機能するケモカインに関連する遺伝子である。その中で、*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL8*, *CCL20*は、免疫反応において樹状細胞やT細胞、B細胞などの誘因物質として機能するケモカインに関連する遺伝子である。その中で、*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*は元株添加群でも発現量が増加していたことから、乳酸菌の接着菌数および取り込み菌数が増加した組換え体添加群ではこれらの遺伝子発現がさらに増加したと考えられる。また、*CXCL8*, *CCL20*は組換え体添加群でのみ顕著に発現量が増加していた。過去の研究では Invasin の由来であるエルシニアが細胞内への侵入を介して *CXCL8* や *CCL20* を強く誘導することが報告されている。このことから組換え体添加群における *CXCL8*, *CCL20* 発現量の増加は Invasin 依存的である可能性が示唆された。

TNFAIP3, *NFKBIA*, *BIRC3*は、組換え体添加群において発現量が増加しており、これらの遺伝子は炎症性の反応に広く関与する転写因子 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)によるシグナルを抑制する機能を持つ遺伝子であることがわかっている。組換え体添加群では、ケモカイン関連遺伝子の発現が強く誘導されていたことから、それに伴い *TNFAIP3*, *NFKBIA*, *BIRC3* が誘導され、過剰な炎症

応答を防ぐ機構が働いた可能性が考えられる。

FNDC9, *TSPAN11*はそれぞれフィブロネクチンおよびテトラスパニン関連遺伝子である。フィブロネクチンは細胞接着分子であり、テトラスパニンや、*Invasin*の受容体である $\beta 1$ -integrinなどと結合することが知られており、 $\beta 1$ -integrinを介したシグナル伝達に関与することも報告されている。また、テトラスパニンも $\beta 1$ -integrinと関わる深い物質である。テトラスパニンは膜貫通タンパク質の一種であり、細胞膜上で $\beta 1$ -integrinと複合体を形成し細胞同士の接着に関与することが報告されている。以上のことより、これらの遺伝子発現の差は*Invasin*発現乳酸菌における細胞への接着能力の向上および、細胞から取り込まれる能力が向上したことに関与している可能性が示唆された。

上記以外で発現に差が見られた遺伝子については、その機能がほとんど解明されていない、あるいは、本実験との関連性を見出すことができなかったため、考察は割愛する。

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、ノサン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 300 株を追加作成し、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。細胞のトランスクリプトーム解析の結果から、組換え乳酸菌に曝されたヒト腸管上皮細胞内では分子レベルでどのような影響が起こっているかについて観察することができ、今後このような手法を用いることにより、組換え微生物がヒト腸管上皮細胞にどのような影響を与えるかの評価が可能であり、安全性評価に活用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

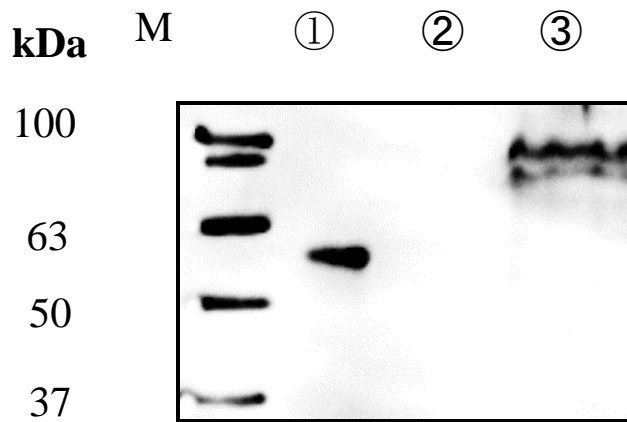
1. 論文発表

- ① 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. doi: 10.1186/s12866-016-0667-x.
- ② 田中尚人、宮崎智、鈴木智典、富田理、梶尾揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。ユーザーの求める機能性乳酸菌株のオンライン選抜システムの開発。日本微生物資源学会誌 33 (1) 31-37, 2017年06月
- ③ 梶田和彌、角亦麻梨子、仁木敏郎、飯野久和、五十君静信。乳酸菌を用いたガレクチン9の発現とその生物活性評価。学苑・生活科学紀要 No. 926:15-20 (2017. 12)

2. 学会発表

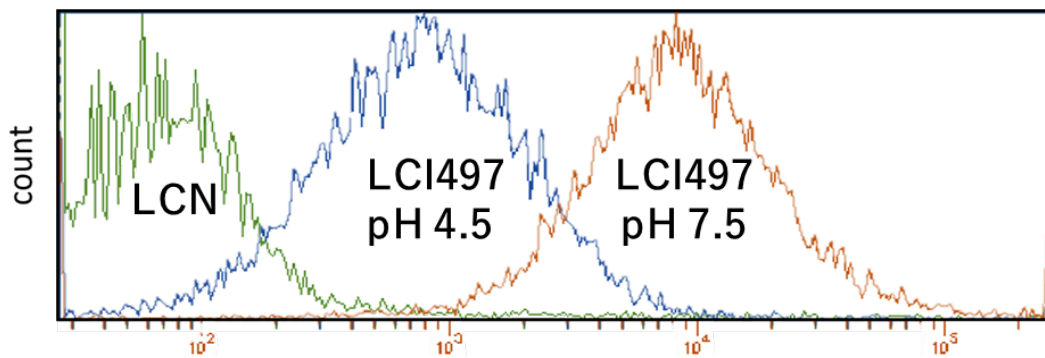
- ① 石橋諒、箕川剛、中島光一、古庄律、清水誠、五十君静信。腸管上皮モデル細胞 Caco-2 キットによる既存添加物食用色素の吸収特性評価。日本食品化学学会。2017.6.1-2。三重県志摩市
- ② 武田昌之、榊田和彌、梶川揚申、横田健治、五十君静信。ヒト腸管上皮細胞モデルを用いた *Yersinia* 由来 Invasin 発現乳酸菌の評価。日本乳酸菌学会。2017.7.10-11。福岡
- ③ 武田 昌之、榊田 和彌、梶川 揚申、横田 健治、五十君 静信。ヒト腸管上皮細胞モデルを用いた *Yersinia* 由来 Invasin 発現乳酸菌の評価。日本農芸化学学会年次大会。2018.3.16 名古屋

3. その他発表



[Fig.1] Western blot による Invasin の発現確認

- ① His-Inv497 (Positive control)
- ② LCN
- ③ LCI497



[Fig.2] Flow cytometer による Invasin の菌体表層発現量の確認

図 1 . Invasin 発現乳酸菌の western blot による発現確認と Flow cytometer による菌体表層発現の確認

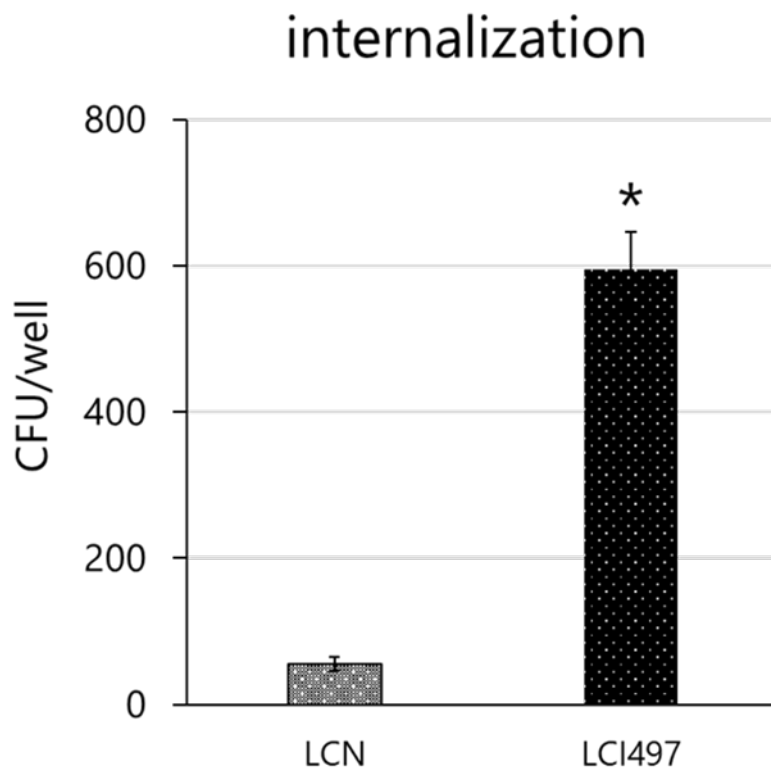
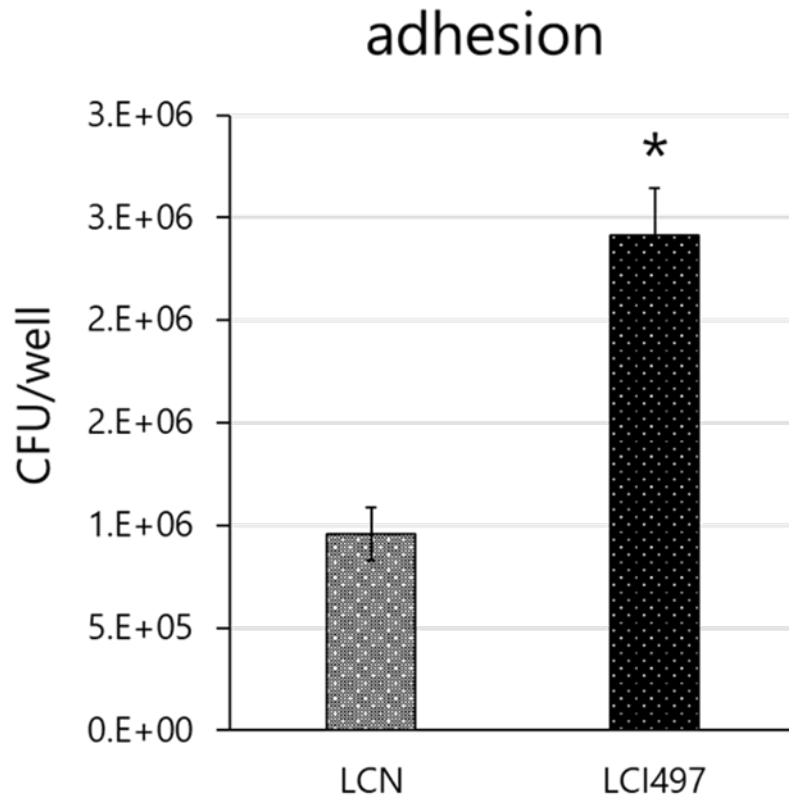


図2. C2BBel1 細胞への接着菌数および取り込み菌数

n=6, Student's t-test, *P < 0.01, mean±SE

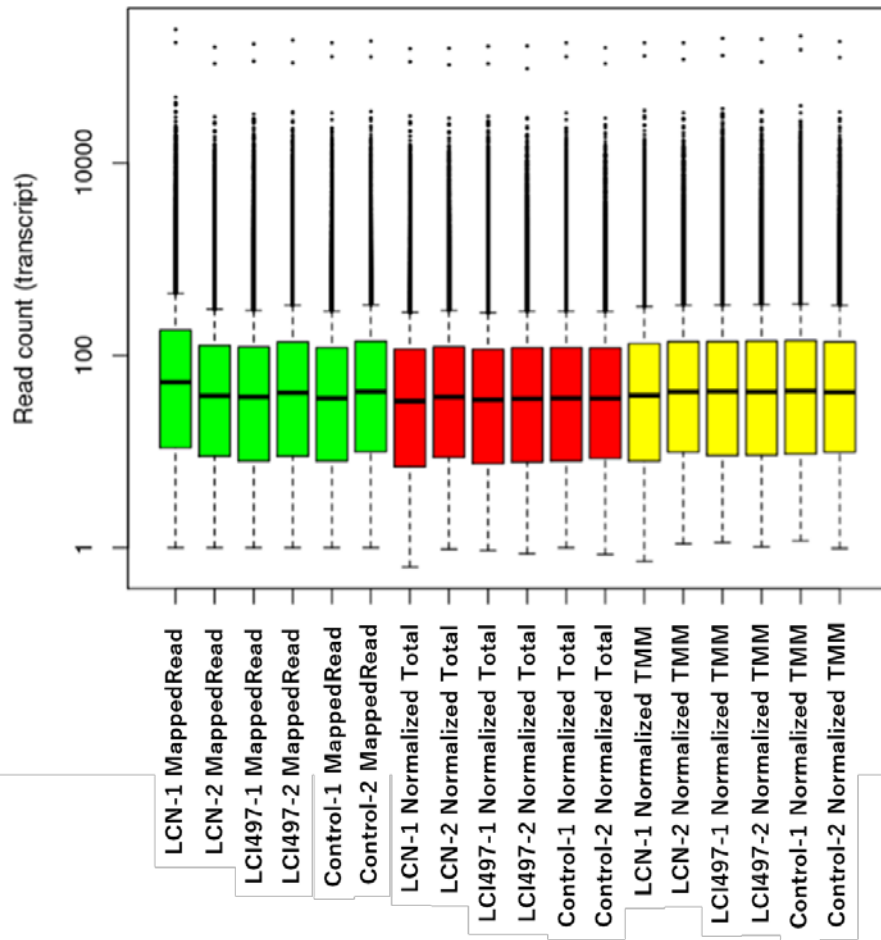


図3. トランスクリプトごとのリード数 分布図

生データ(緑), 総リード数による補正後(赤), TMM 法による正規化後(黄)

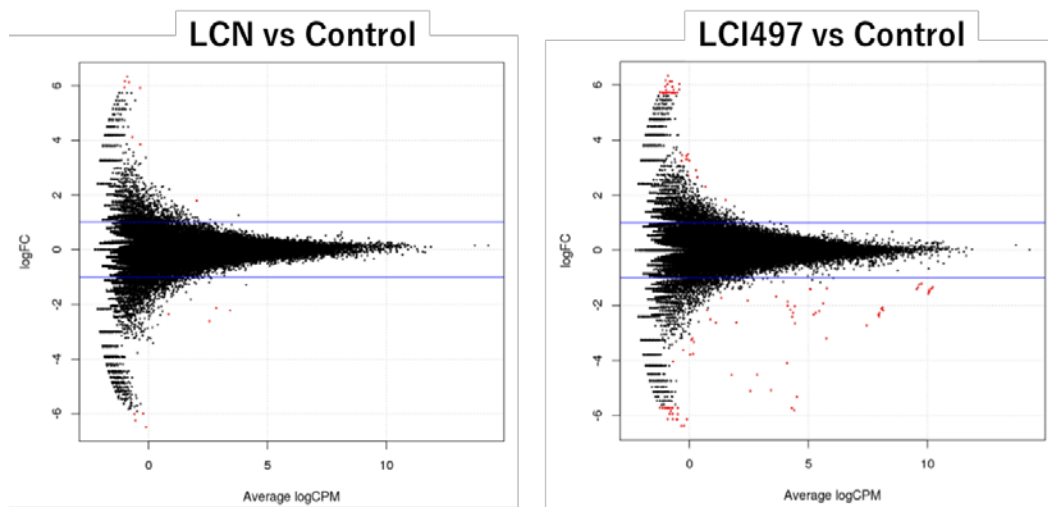


図4. 尤度比検定による発現量差の検定結果 MAプロット
 横軸は2群間の平均発現量、縦軸は2群間の発現量比を表している。

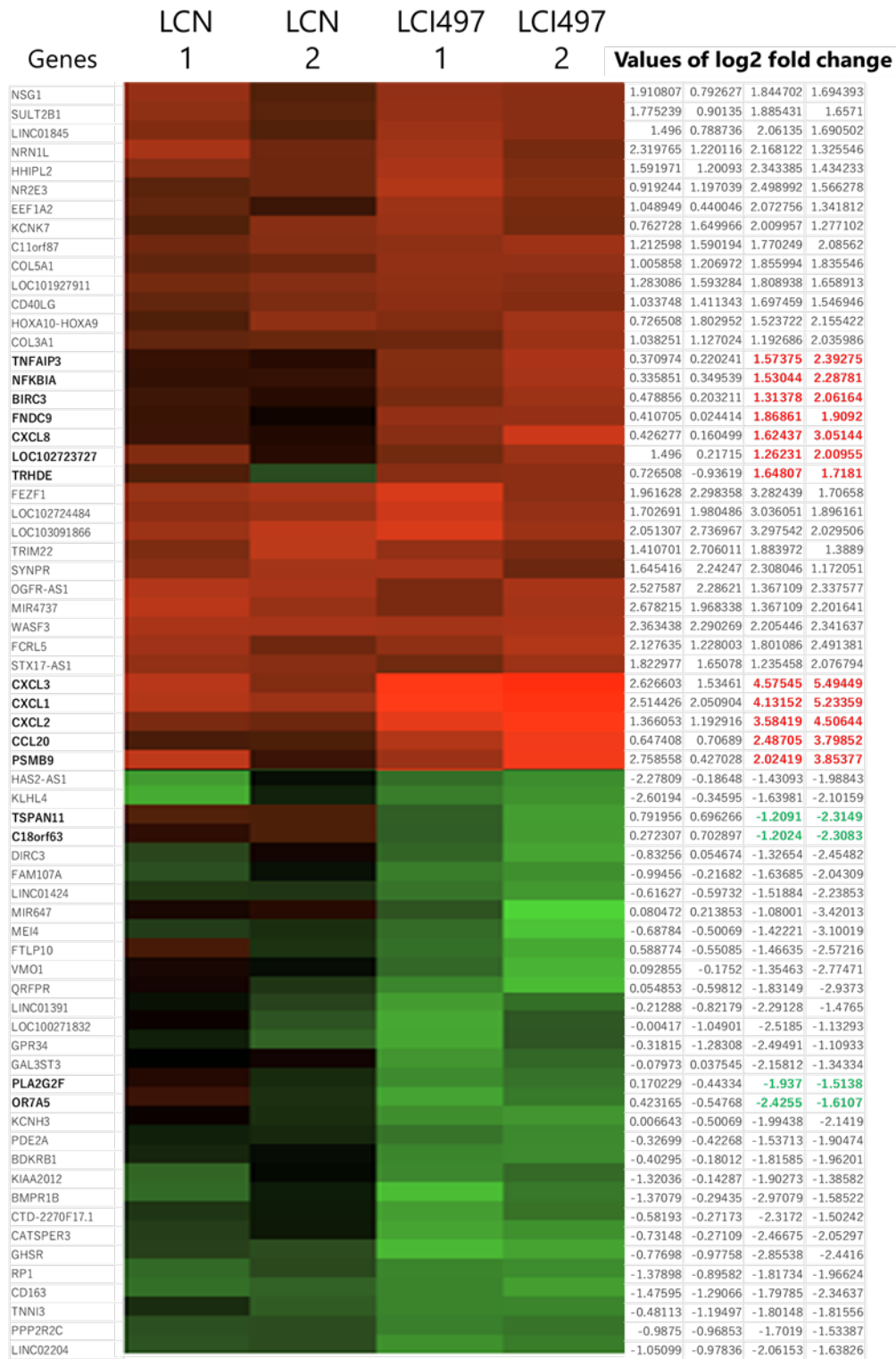
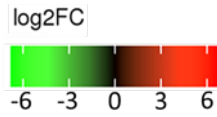


図5. ヒートマップおよび各遺伝子発現量の値
培地コントロールの値を黒(0)として、供試菌添加時の

遺伝子発現量の増加を赤、減少を緑で表している。

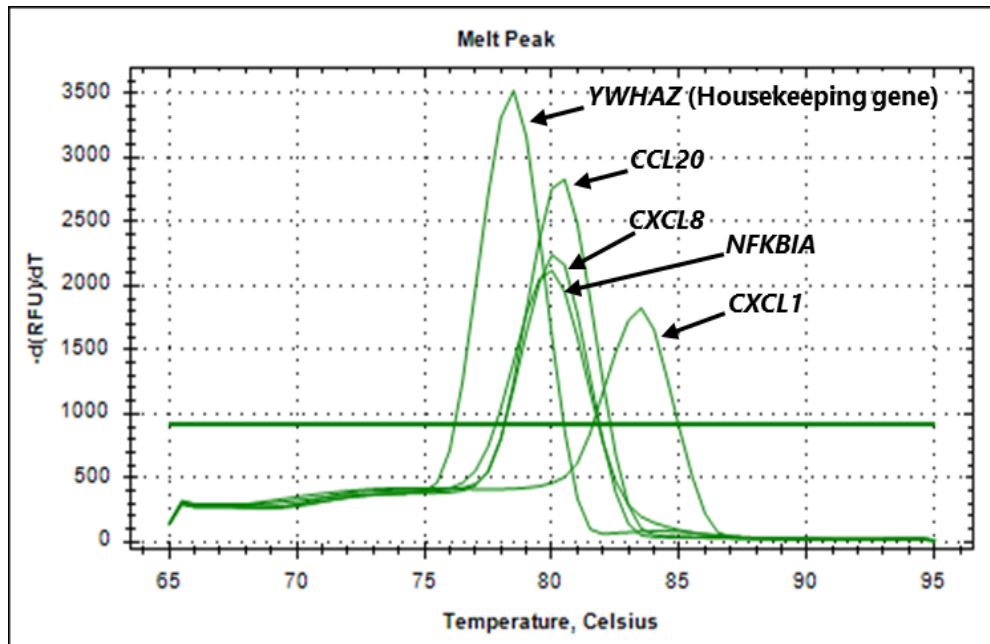


図6. PCR産物の融解曲線（副産物がないことを確認）

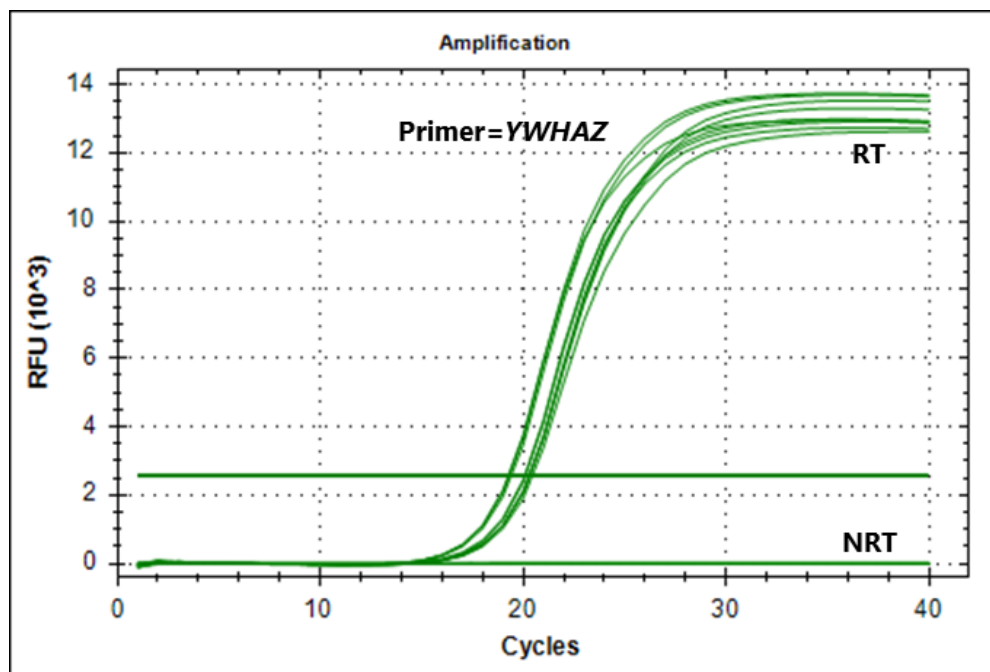


図7. PCR産物の増幅曲線 (DNAの混入がないことを確認)

Relative expression (Target gene/YWHAZ, Control=1)

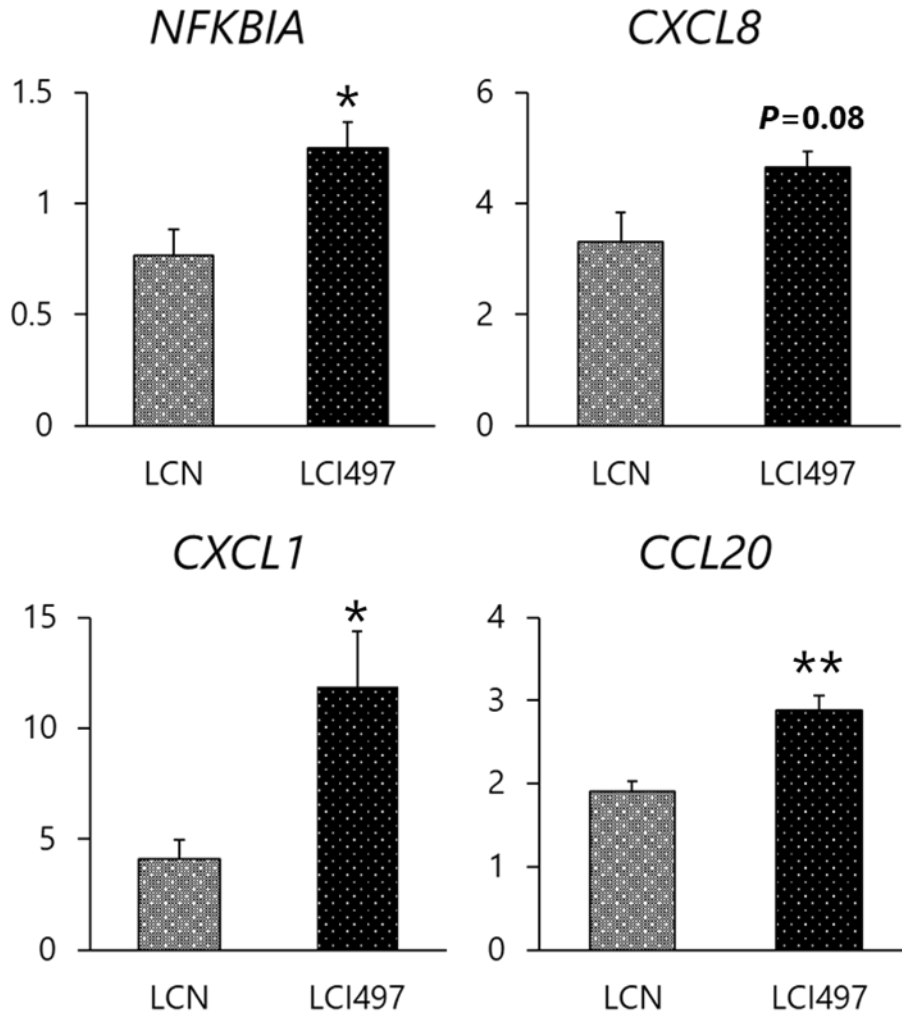


図8. qPCR結果 相対定量による遺伝子発現量の比較

n=3, Student's t-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, mean+SE

Housekeeping gene=YWHAZ