

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、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を行った。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。平成28年度からは遺伝子組換え微生物の安全性評価に有用と思われる評価法の検討として、組換え体とヒト腸管上皮細胞への影響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として頻りに用いられる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行った。培地、宿主乳酸菌、組換え乳酸菌の三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、安全性評価に活用可能と思われる。

手島玲子 徳島文理大学香川薬学部

協力研究者

梶田和彌 東京農業大学/昭和女子大学

小関良宏、宮原平 東京農工大学大学院

太田大策 大阪府立大学大学院
梶川揚申、檜木真吾、武田昌之、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を行った。平成 28 年度からは遺伝子組換え微生物の安全性評価に有用な評価法として、組換え体のヒト腸管上皮細胞への影響に関する検討を行った。

B. 研究方法

(1) 網羅的オミクス解析

遺伝子組換えモデル乳酸菌としては、サルモネラ鞭毛抗原（フラジェリン）の遺伝子を乳酸菌用ベクタープラスミドに組み込み、菌体表層に固定化して発現させた。比較には元

株である *Lactobacillus casei* IGM393 株を用いた。手法の詳細については、当該年度 of 分担報告書を参照。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）。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ム解析を行った。詳しい分析方法等は、手島博士分担報告書を参照。

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。

菌体の処理方法、分析方法等は、平成 27 年度太田博士分担報告書参照。

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。

プロテオーム解析用追加試料として、以下の検体を作成した。GM 乳酸菌の比較対象として、フラジェリン抗原を菌株表層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、アンカーの電氣的チャージにより菌体表層に結合させて作成した。

解析方法：元株、遺伝子組換え体、人工固定乳酸菌（非組換え体）の 3 種の乳酸菌のたんぱく質発現の差を 2D-DIGE で解析した。

(2) 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。

(3)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。定法にしたがい培養・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℃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) 網羅的オミクス解析

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。図など詳しいデータは “新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究” 平成 27 年度総括・分担研究報告書の手島博士の分担報告書に示した。

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。図など詳しいデータは “新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究” 平成 27 年度総括・分担研究報告書の太田博士分担報告書に示した。

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。図など詳しいデータは“新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究”平成 27 年度総括・分担研究報告書の五十君分担報告書に示した。

この結果を受けて、元株及び GM 株の全ゲノム解析を行い、観察されたゲノムの一部の大幅な欠損が生じているかどうかの検証を行ったところ、GM 株では、ゲノムが欠損していることが検証された。この結果を受けて、遺伝子欠損部分のトランスクリプトームの評価を除き、再度 GM と non-GM 株におけるトランスクリプトーム評価を行った結果を表に示した。

(2) 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テ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テ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テ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。

(3) 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、取り込みを起こすかを評価したところ、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、メッセンジャー 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。

尤度比検定による発現量差の検定結果 MA 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平成 29 年度報告書に示した。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 (*NFKBIA*, *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。

D. 考察

(1) 網羅的オミクス解析

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ことが今回の全ゲノム解析の結果、確認された。この領域以外の遺伝子で発現が変動している遺伝子は、プロテ

オーム解析で得られたGMとnon-GMの間に認められた細胞壁の分解酵素について、トランスクリプトーム解析でも同様な結果が得られた。

(2) 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。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°Cあるいは 37°C 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。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(イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来)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。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 β 1-integrin などと結合することが知られており、 β 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 β 1-integrin と関わりの深い物質である。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 β 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

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示唆され、全ゲノム解析を行ったところ、GM 株の一部の遺伝子群の欠損が確認された。欠損部分を除いた、両者の差は、プロテオーム解析と同様に細胞壁の分解酵素の増加が示された。

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 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 C2BBel1 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。それぞれの遺伝子の動きを評価することが可能であり、この手法は組換え体とヒト腸管上皮細胞との反応に関する評価系として非常に有用な評価系であると思われた。

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)
- ④ 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 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。カルチャーコレクションからの乳酸菌株情報発信の試み。乳酸菌学会セミナー(2015.5、サンライズ淡路)
- ② 梶川 揚申、緑川 恵美子、近藤 和穂、入澤

友啓、梶田 和彌、五十君 静信、田中 尚人、岡田 早苗。*Lactobacillus agilis* BKN88 のべん毛におけるフラジェリンの構成。日本乳酸菌学会 2015 年度大会。2015.7。和洋女子大

- ③ 赤間一望、田中健一、石浜峻、梶田和彌、佐々木泰子、川名敬、五十君静信。*Lactobacillus casei* IGM394 を用いた HPV 16 E7 ワクチンの開発。日本乳酸菌学会 2015 年度大会。2015.7。和洋女子大
- ④ 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。カルチャーコレクションからの乳酸菌株情報発信の試み。日本乳酸菌学会 2015 年度大会・セミナー。2015.7
- ⑤ 田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。有用乳酸菌株の情報公開。日本微生物資源学会。2015.9.和洋女子大
- ⑥ 高倉麻菜美、田中尚人、鈴木智典、富田理、梶川揚申、内野昌孝、五十君静信、岡田早苗。東京農大菌株保存室に保存されている菌株の機能～*Micrococcus luteus* に対する抗菌性について～。食香粧研究会。2015.9
- ⑦ 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
- ⑧ 関根 侑、野口 実莉、石浜 峻、梶田 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
- ⑨ 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
- ⑩ 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

- ⑪ 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
- ⑫ 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
- ⑬ 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
- ⑭ 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
- ⑮ 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。
- ⑯ 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
- ⑰ 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。日本農芸化学会年次大会。2018.3.16 名古屋

3. その他発表