

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05818

研究課題名（和文）機能性乳酸菌を作出するための新規ゲノム改変技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel genome modification technology to produce functional lactic acid bacteria

研究代表者

鹿志毛 信広（Kashige, Nobuhiro）

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：80185751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト常在細菌である乳酸菌は発酵食品や医薬品の製造に古くから利用されており、ヒトに対する安全性が確立されている。本研究では『機能性乳酸菌を作出するための新規ゲノム改変技術の確立』を目指し、選択圧の無い環境下においても遺伝的形質を安定に保持し、なおかつ危険な薬剤耐性菌を生じる可能性のある薬剤耐性遺伝子を除去することが出来るゲノム組み込み型宿主ベクターの開発と、ゲノムに配座した薬剤耐性遺伝子を除去するシステムの構築を行なった。その応用例としてエイコサペンタエン酸（EPA）合成遺伝子を乳酸菌に組み込み、予防医学的に脂質異常症の改善に活用できる経口投与可能なEPA産生乳酸菌の作製を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸菌をドラッグデリバリーシステムに応用する研究では、いまだ薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドを用いた遺伝子組換え技術に依存しており、このことは医療目的として人に直接投与するには二つの問題を生じる。まずプラスミドが有する薬剤耐性遺伝子に依存して薬剤選択圧の下に保持されている外来遺伝子は、選択圧のないヒト標的臓器内ではプラスミドが脱落した菌が優勢に出現することでその治療効果は低下する。次に組み換え乳酸菌の中でプラスミドに保持される薬剤耐性遺伝子の存在は思わぬ耐性菌の出現を招く危険性がある。本研究において構築されたシステムはこれらの問題を明確に回避するもので、その社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Lactic acid bacteria (LAB), which are indigenous to humans, and their safety for humans is well established. In this study, we aim to establish a novel genome modification technology to produce functional LAB by developing a genome-integrated host-vector that can maintain genetic traits stably under no selection pressure and can remove drug-resistant genes that may cause dangerous drug-resistant bacteria, as well as by developing a system to remove drug-resistant genes that are in the genome. We have developed a genome-embedded host-vector that can remove drug-resistance genes that can produce dangerous drug-resistant bacteria, while maintaining stable genetic traits even under non-selective pressure. As an example of the application of this system, we attempted to produce EPA-producing lactic acid bacteria that can be orally administered for the improvement of dyslipidemia in preventive medicine by incorporating the EPA synthesis gene into LAB.

研究分野：応用微生物学、生物系薬学

キーワード：乳酸菌 ゲノム改変 EPA ゲノム組み込み型ベクター

1. 研究開始当初の背景

ヒト常在細菌である乳酸菌は非病原性、非侵襲的であることから、発酵食品や医薬品の製造に古くから利用されており、ヒトに対する安全性が確立されている。近年では経口摂取された乳酸菌が生きて腸管に達する性質を利用して、治療を目的とした遺伝子産物を標的臓器へ運搬する『キャリア』としての有効性が注目され、乳酸菌を遺伝子組換え技術により改変し、ドラッグデリバリーシステムに応用する研究が急速に発展しつつある (Carmen S et al. J Clin Gastroenterol. 2014 48, S12-17)。しかしながら多くの研究において、いまだ薬剤耐性遺伝子を保持するプラスミドを用いた遺伝子組換え技術が用いられており、このことは臨床において、二つの問題を生じさせる。

まず、プラスミドが有する薬剤耐性遺伝子に依存して薬剤選択圧の下に保持されている外来遺伝子は、選択圧のないヒト標的臓器内ではプラスミドを脱落した菌が優性に出現することによって、導入された外来の遺伝的形質による治療効果が低下すると考えられる(図1)。すなわちプラスミドを用いた遺伝子組み換え乳酸菌は、遺伝的形質の安定性に問題がある。次に、組み換え乳酸菌の中でプラスミドに保持される薬剤耐性遺伝子の存在は、その生育環境によっては接合や貪食によって思わぬ耐性菌の出現を招く危険性がある。このことから遺伝子組み換え乳酸菌を医療目的において人に直接投与するには、これらの問題を回避する解決策を明確に講じる開発が必要である。

一方で、我が国における医科診療医療費を主傷病による傷病分類別にみると、「循環器系の疾患」が最も多く、その原因として肥満、喫煙、過度な飲酒、高血圧症、糖尿病、脂質異常症などがある(厚生労働省(2022),「令和2(2020)年度国民医療費の概況」)。その中で脂質異常症は自覚症状がほとんどなく、突発的に心筋梗塞や狭心症、脳梗塞などを発症させる病気であり、その治療法は食事療法、運動療法、薬物療法を主軸として行われている。その薬物療法の一つとして、悪玉コレステロールを低下させる働きを有するEPA製剤が保険診療へ適用され、また同じくEPAやDHA含有の特定保健用食品などが開発されているが、症状改善を目的としてこれらを使用する場合、その継続的な摂取は大きな負担となる(MEDLEY(2022),「脂質異常症の治療:食事療法、運動療法、薬物療法など」)。その代替品として、恒常的に摂取せずとも人腸管内において良性的脂肪酸を産生する遺伝子改変生菌製剤などの開発が試みられている。

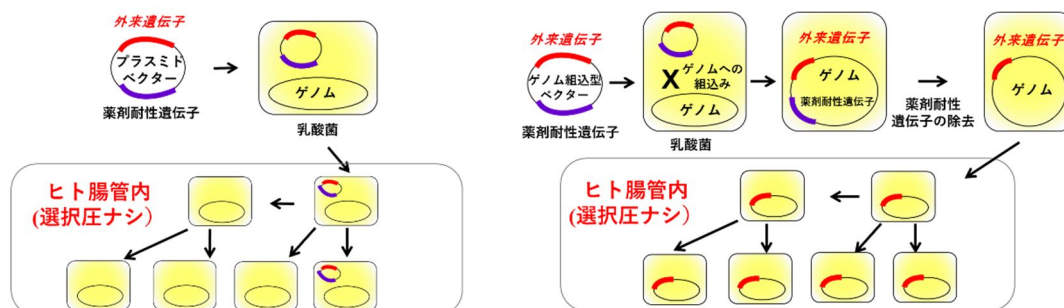


図1.プラスミドはヒト腸管内で外来遺伝子を維持できない

図2.ゲノム組込型はヒト腸管内で外来遺伝子を維持できる

2. 研究の目的

本研究では選択圧の無い環境下においても遺伝的形質を安定に保持し、なおかつ危険な薬剤耐性菌を生じる可能性のある薬剤耐性遺伝子に依存しない安定かつ安全な乳酸菌の遺伝子改変技術を確認することを目的として、ゲノム組み込み型宿主ベクターの開発と(図2)、さらに、組換えによってゲノムに配座した薬剤耐性遺伝子を除去することが出来るカウンターマーカーと *in vivo* excision システムの構築を行なう(図3)。このシステムで作出した組換え乳酸菌を用いた応用例として、エイコサペンタエン酸(EPA)合成遺伝子を導入した組換え乳酸菌を作製し、高

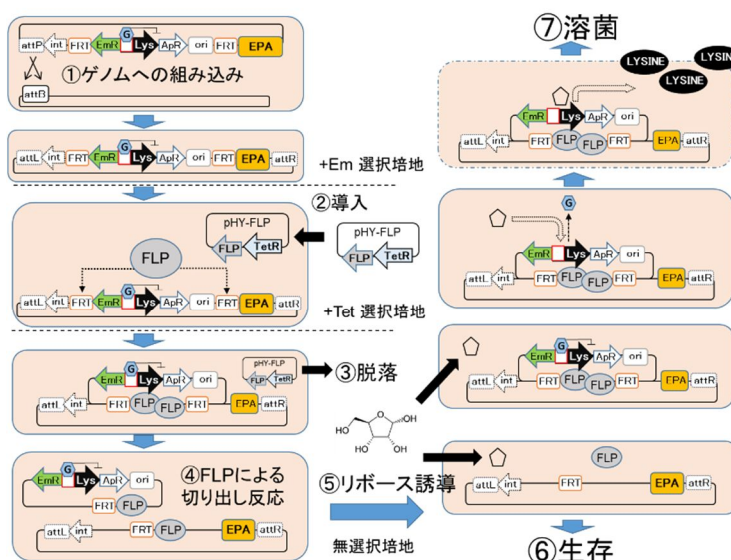


図3.カウンターマーカーと *in vivo* excision システム

脂血症モデルマウスに対して経口投与による治療実験を行なうことでこれらのモデルマウスの病態改善に組換え乳酸菌が有効かどうかを検討した。

3. 研究の方法

本研究では安定かつ安全な乳酸菌の遺伝子改変技術を確認したうえで、さらに応用例として高脂血症モデルマウスに対して EPA 合成遺伝子を導入した組換え乳酸菌を作製し、経口投与による治療実験を行なうことでモデルマウスの病態改善に組換え乳酸菌が有効かどうかを検討する。このために以下の①～④を実施した。

乳酸菌ゲノム組み込み型ベクターの構築

ヒト糞便中から単離された *Lactobacillus casei* ATCC27092(以下 *L.casei*:全ゲノムシーケンス同定済、未発表)に溶原化する PL-2 ファージ integrase 遺伝子とアタッチメントサイト (attP)からなる部位特異的組換え領域を用いて大腸菌ではプラスミド型、乳酸菌ではゲノム組み込み型として機能するシャトルベクター pAEO を構築した。一方、その宿主として PL-2 ファージ溶原株である *L.casei* から PL-2 ファージを脱落させたキュアリング株 (C5 株)を単離した。

致死性遺伝子 (カウンターマーカー) の作製

ゲノム組み込み型で乳酸菌ゲノムに外来遺伝子と同時に配座するベクター由来の大腸菌の複製ユニット (Ori) とエリスロマイシン耐性遺伝子 (EmR) を含めた不要領域を除く *in vivo excision* システムを構築する。不要領域に予め誘導性の致死性遺伝子 (カウンターマーカー) を導入することで、不要領域が切り出されなかったクローンは誘導的に死滅させ、不要領域が切り出されたクローンのみを選択することができる。カウンターマーカーは、D-リボースで発現が亢進する *L.casei* に由来する GlcNacase のプロモーター領域と *L.casei* の溶菌性ファージである PL1 の Holyn と Lysin 遺伝子 (溶菌酵素遺伝子: Arch Virol. 2000, 145 (8) :1521-34) を連結することでリボース誘導性の致死性遺伝子 (Glys) として作製した (図 4)。すなわち Glys を導入した乳酸菌は D-グルコースを含む培地では生育するが、D-リボースを含む培地では増殖が抑制されることを期待する。

in vivo excision システムの作製

乳酸菌ゲノムに配座した不要領域を除去する *in vivo excision* システムの構築は酵母に由来する組換え領域 (FRT) と組換え酵素 (FLP) を利用する。ベクターは FRT の内側に Ori と EmR および Glys を、外側に Integrase と外来遺伝子 (EPA) を挿入する形で作製する (図 3-)。FLP はテトラサイクリン耐性マーカー (TetR) またはクロラムフェニコール耐性マーカー (CmR) を有するヘルパープラスミド pHY-FLP によって乳酸菌に導入する (図 3-)。テトラサイクリン選択培地にて FLP の発現を確認したのち、テトラサイクリンを含まない培地で継代することで、pHY-FLP は脱落する (図 3-)。この条件では菌体内において Ori と EmR および Glys が FRT-FLP によって切り出されたクローンのみをリボース誘導性を得ることができる (図 3- 、)。また、FRT-FLP によって切り出されずに Glys が残ったクローンは溶菌する (図 3-)。この *in vivo excision* システムを用いて、EPA を発現する組換え乳酸菌を作製し、選択圧のない環境下での遺伝的形質の安定性や導入遺伝子の発現解析を行なう。

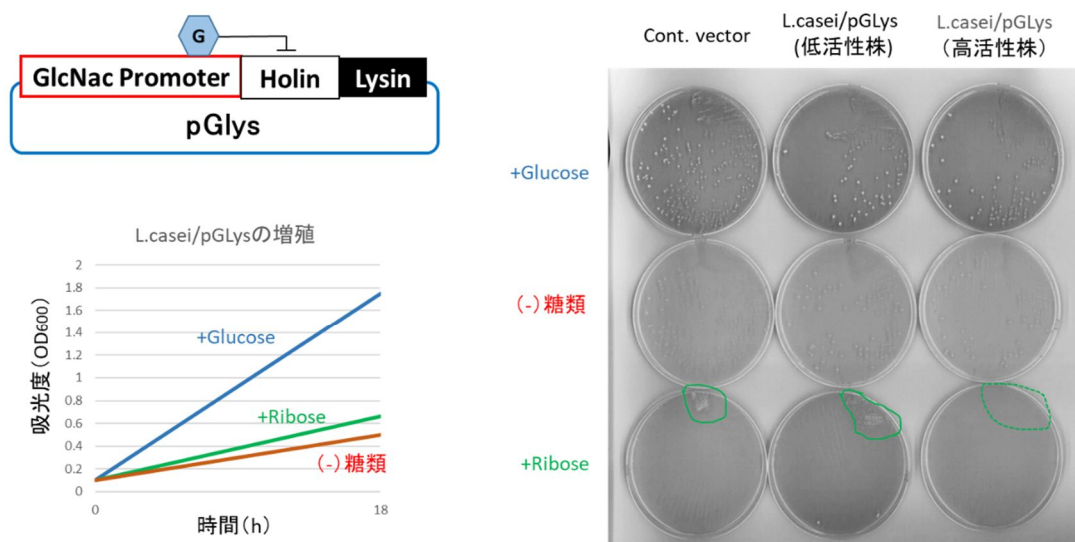


図4.Glys遺伝子の構造とRibose誘導による増殖抑制

EPA 合成遺伝子導入組換え乳酸菌を用いた高脂血症マウスの治療実験

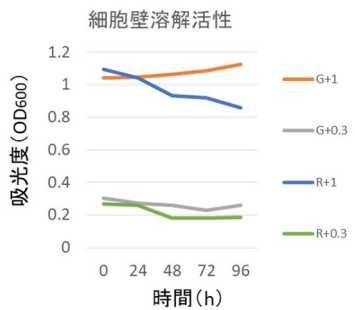


図5.Glys遺伝子による溶菌活性

EPA は高脂血症の改善効果を有する (Lancet 1978;2:117-9)。本研究ではイワシの腸内細菌である *Shewanella* sp. に由来する EPA 合成遺伝子 (Microbiology (1997), 143, 2725-2731) を発現する乳酸菌を高脂血症モデルマウスに経口投与することで病態が改善されるかどうかを検討する。高脂血症モデルマウスは C57/BL6 マウスに高脂血症発症マウス作製飼料 (F2WTD, オリエンタル酵母) を離乳時より 30 週間摂取させて作製する。その間コントロールの C5 株と EPA 発現株 $2 \times 10^7 / 0.1 \text{ml}$ を経口投与 (胃内) する。投与期間は 1 週間に一度、30 週間行ない、血中の総コレステロール値、LDL および HDL コレステロール値、中性脂肪値などを測定し、高脂血症の発症と改善を評価する。

4. 研究成果

pAE0 を C5 株を形質転換したところ、選択圧のない条件下 70 世代の培養後においても pAE0 は形質転換体ゲノム上に安定に保持されていた。このことから外来形質を *L. casei* に導入するには通常行われているプラスミドによる形質導入ではなく、ゲノムへの組み込みによる導入がより安定に保持できると考えられた。

Glys を有するプラスミド (pGlys) を導入した *L. casei* (*L. casei*/pGlys) は D-リボースを含む培地では増殖抑制を示し、その培養上清に *L. casei* 細胞壁凍結乾燥品の溶解活性を認めた (図 4, 5)。また *L. casei*/pGlys は D-グルコースを含む培地寒天培地や糖類を含まない寒天培地は正常にコロニーが生育するが、D-リボースを含む寒天培地では生育できなかった (図 4)。このことから Glys は D-リボースを含む培地ではカウンターマーカーとしてネガティブセレクションに利用できると考えられた。

FRT-FLP によって、まず切り出せる領域を最小化する意味で FRT-Glys-FRT 配列を C5 株ゲノムに導入した株 (C5 株/FRT-Glys-FRT) を作製した。これに FLP を発現するヘルパープラスミド pCHILFLP を形質導入し、FLP の発現と FLP 作用性の FRT-Glys-FRT 組み換えを検証した。FLP の発現プラスミドの作製には乳酸菌に由来する NaCl 誘導性の *OpuA* 遺伝子と LDH 遺伝子のプロモーター (Biol. Pharm. Bull.2013 36(6): 952-8. と BMC Biotechnol. 2014 May 10;14:38.) を

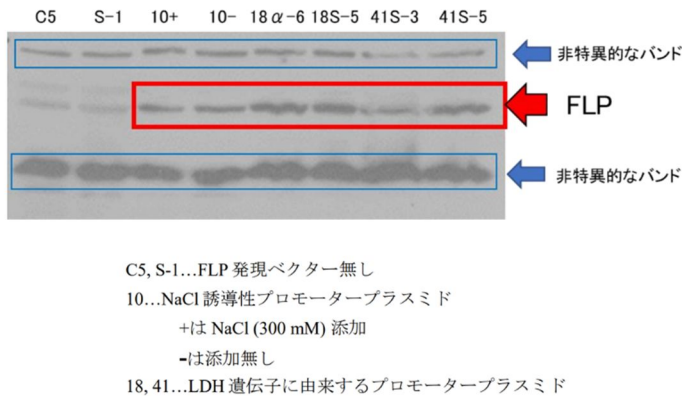


図6. 各種C5株/FRT-Glys-FRTのFLPの発現解析

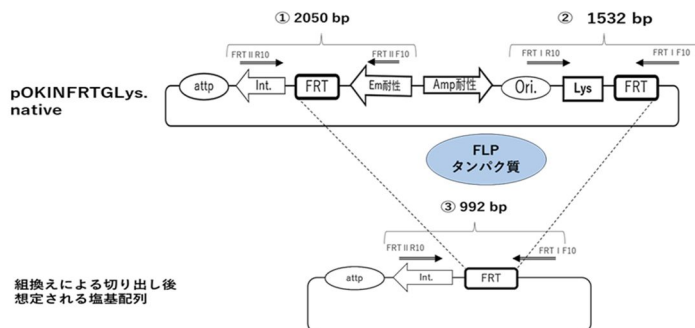


図7.PCRによって確認される切り出しの有無領域のプライマーセットとPCRによって確認されるフラグメントの大きさ

を用いたところ、LDH 遺伝子のプロモーターによる発現の方が強かった (図 6)。同様に、LDH 遺伝子のプロモーターを用いたヘルパープラスミドを導入された C5 株 /FRT-Glys-FRT の方が効率よく FRT-Glys-FRT 組み換えによる Glys 遺伝子を脱落した株を得ることが出来た (図 7, 8)。

さらに、FRT-FLP によって切り出せる領域を拡大し、FRT 間に大腸菌のクローニングに機能的な配列や薬剤耐性遺伝子を含む FRT-EmR-AmpR-Ori-Glys-FRT 配列を C5 株ゲノムに導入した株 (C5 株 /FRT-EmR-AmpR-Ori-Glys-FR) を作製し、ヘルパープラスミド pCHILFLP の形質導入による FRT 間の組み換え反応を検証した。その結果、図 9 に示す方法にて FRT 間の組み換えを起こした単一株の分離に成功した (図 8)。

EPA 合成遺伝子を C5 株ゲノムに導入した株 (C5 株/EPA) はガスクロマトグラフィーによって産生を確認している。より厳密に産生された EPA の質量分析を

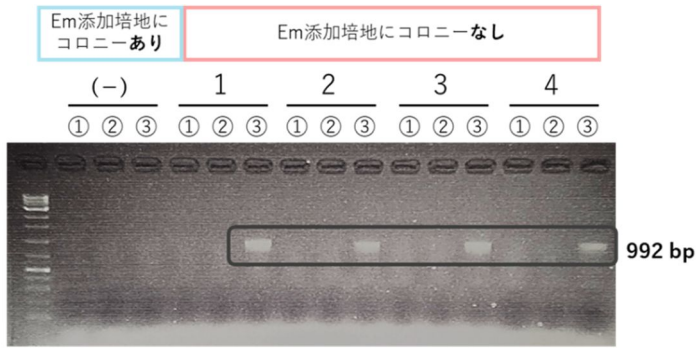


図8. レプリカ法によってEmRを持たない株およびEmに対する耐性がある株のゲノムDNAにおけるPCRフラグメント

試みたが、EPA は検出されなかったことから、菌体祖抽出物の調製やそれに含まれるEPAのメチル化条件などを検討する必要がある。一方で疫病カビ (*Saprolegnia diclina*) のEPAの産生はC18:1のアラキドン酸からC20:5のEPAと変換されること、その過程でデルタ 17-Desaturase の活性が必須であることが報告されている (Appl Microbiol Biotechnol 2013 97:1973-1985)。我々が作製したC5株/EPAによるEPAの産生は野生型 *L. Casei* のC18:1に対してピークが減少していることから、C5株/EPAにおいてもEPAの産生にC18:1が利用されている可能性がある。今回C5株ゲノムへ17-DesaturaseのcDNAを導入したが、RNAレベルで発現が見られなかった。ゲノム上に1コピーだけ保有する組み換え体では発現が十分でないことから、より強力なプロモーターの探索が必要と考えられた。以上から今回の研究期間においてはEPA産生株を用いた高脂血症モデルマウスの治療実験は行っていない。

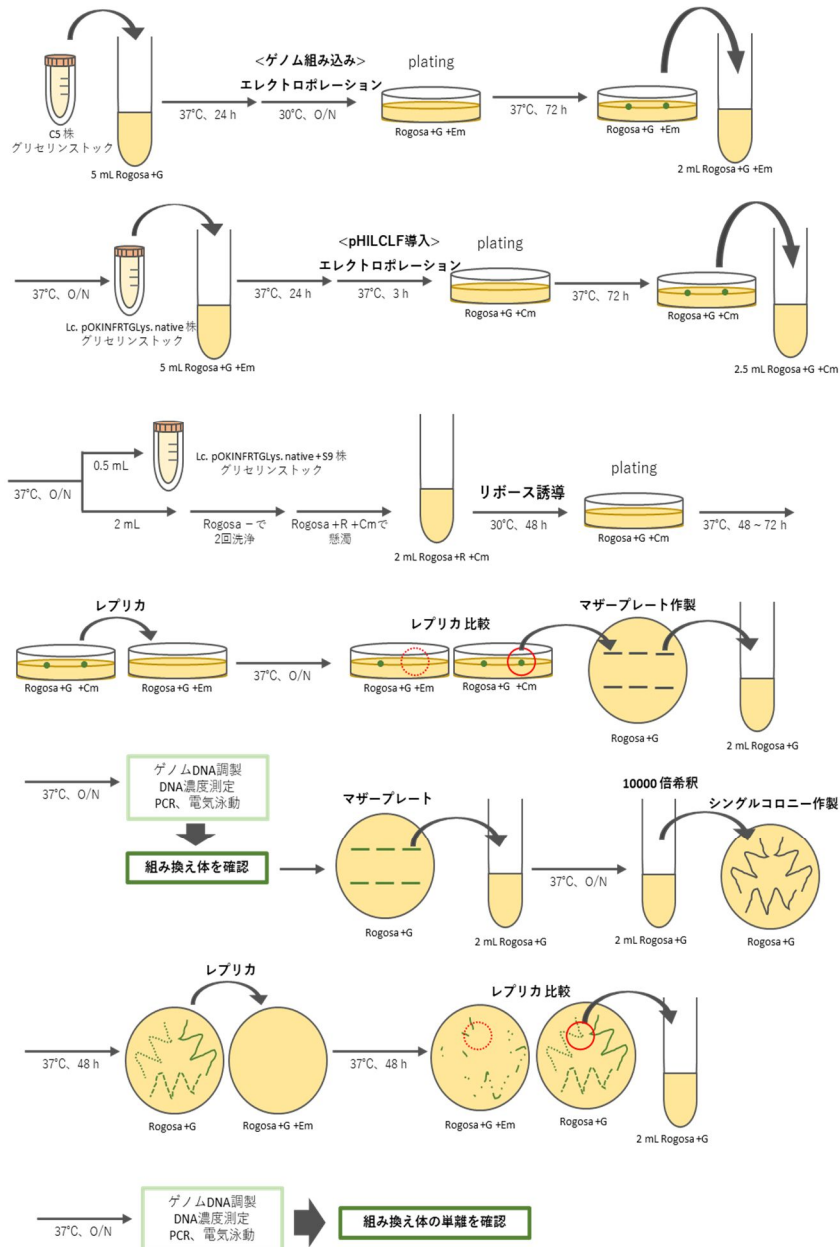


図9. FRT 間の切り出しが行われた乳酸菌のみを選別するまでの実験操作の流れ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 朝光 (Satho Tomomitsu) (90369025)	福岡大学・薬学部・教授 (37111)	
研究分担者	山本 雅達 (Yamamoto Masatatsu) (40404537)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関