

一般演題 16

Enterococcus faecalis EC-12株殺菌菌体投与によるマウス肝臓の抗酸化作用The Anti-Oxidant Effect of the Heat-Killed and Dried Cell Preparation of *Enterococcus faecalis* Strain EC-12 Administration in Murine Liver○塚原隆充¹, 山田 薫¹, 亀上知世子¹, 葛西 順², 河井一明³, 伊地知哲生⁴, 武川和琴⁴¹栄養・病理学研究所, ²OHG研究所, ³産業医科大学, ⁴コンビ

【目的】肝障害モデル動物への乳酸菌投与が、肝機能を改善することが知られている。一方で健常な動物への乳酸菌投与による抗酸化作用についてはあまり検討がない。本研究では、乳酸菌である *Enterococcus faecalis* EC-12株の殺菌菌体 (EC-12) を用いて、健常マウスへの投与が肝臓の抗酸化作用に及ぼす効果を検討した。

【方法】(実験1) 8週齢のBALB/c系雄マウスを15頭導入した。1週間の馴化後、1群にはEC-12を生理食塩水に懸濁して毎朝10時に10 mg/kg B.W.で強制経口投与した (n=8)。もう1群には生理食塩水を同様に投与した (n=7)。4週間毎日投与後、肝臓を摘出し、病理組織学的検査及びtotal RNA抽出に供した。Total RNAは逆転写後、Mn-superoxide dismutase (SOD) 及びCu/Zn-SOD mRNA発現をtaqman real-time PCRで定量した。残余肝臓中の8OH-dG濃度を測定した。血清中のGOT及びGPT濃度を測定した。(実験2) 8週齢のDBA/1J雄マウスを20頭導入した。1週間の馴化後、1群にはEC-12を蒸留水に懸濁して毎朝10時に強制経口投与 (2 mg/mouse) した (n=10)。もう1群には蒸留水を同様に投与した (n=10)。7週間毎日投与後、肝臓を摘出した。肝臓中のMn-SOD及びCu/Zn-SOD活性を市販キット [SOD Assay Kit - WST (Dojindo Molecular Technologies) 及びProteostain Protein Quantification Kit Rapid (Dojindo Molecular Technologies)] で定量した。

【結果】(実験1) 肝臓中のMn-SOD mRNA発現がEC-12投与で有意に高値を示した (1.33倍) が、Cu/Zn-SODでは有意差は認められなかった (1.12倍)。一方で、肝臓中の8OH-dG濃度に顕著な変化は認められなかった (2.51 vs. 2.68 8OH-dG/10⁶dG)。血清中GOT及びGPT濃度に変化は認められなかった。また、どの肝臓にも病理組織学的な異常は認められなかった。(実験2) 肝臓中のMn-SOD活性がEC-12投与によって有意に高値を示した (30.8 vs. 84.2 U/mg protein) が、Cu/Zn-SOD活性には変化は認められなかった (36.3 vs. 35.5 U/mg protein)。

【考察】健常マウスへのEC-12投与によって、ミトコンドリアに局在するMn-SOD活性が刺激される可能性が示唆された。一方で、酸化ストレスマーカーである8OH-dG濃度に変化は認められなかったことから、EC-12が酸化ストレス源となってSOD活性が刺激された訳ではないと考えられた。

一般演題 17

ヒトフローラマウスモデルにおけるプロバイオティクスと腸上皮細胞のクロストークの解析

Cross-Talk Analysis of Intestinal Epithelial Cells and Probiotics Using Human-Flora Mice

○今岡明美, 島龍一郎, 原 妙子, 石塚沙耶, 梅崎良則
ヤクルト本社中央研究所

【目的】 プロバイオティクス株の単独定着マウスを用いたプロバイオティクス株と腸上皮細胞とのクロストークの解析により, *Bifidobacterium breve* Yakult (BbrY) が小腸より大腸の上皮細胞の遺伝子発現に強く影響を与えることを明らかにした. しかしながら, 腸内での菌の遺伝子発現は共存する他の腸内菌によって影響を受ける可能性が指摘されている. そこで, プロバイオティクス株がヒト腸内細菌との共定着系で腸内有機酸産生と腸上皮細胞の遺伝子発現に与える影響を検討した.

【方法】 乳児フローラ構成を基にして, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* の5株を基本構成とし, *B. breve* Yakult (BbrY群) あるいは *B. animalis* Y99045 (Bani群) を加えたノトバイオームマウスを作製した. 定期的に糞便を採取した後, 28日目に解剖した. 腸内菌の菌数および遺伝子発現をRT-qPCRにより定量した. 有機酸はHPLCを用いて測定した. 腸上皮細胞の遺伝子発現はマイクロアレイで解析した.

【結果と考察】 BbrYはBaniより腸内の菌数および占有率が全定着期間を通じて高かった. 定着初期にはBbrY群ではBani群より糞便中の乳酸, 酢酸濃度が高く, また, BbrYはBaniより lactate dehydrogenase および pyruvate formate lyase の mRNA 発現量 (糞便単位重量あたり) が高かったことから, BbrYは有機酸産生への寄与も高いことが示唆された. *Bifidobacterium* の両株とも5株の基本構成に加えることにより大腸上皮細胞の全遺伝子の発現量の変動幅を収束させ, その影響はBbrYの方が大きかった. 28日目の盲腸内容物の有機酸濃度 (短鎖脂肪酸・乳酸・コハク酸・ギ酸) は両群で差が無かったが, BbrYとBaniは大腸上皮細胞の遺伝子発現に対して, 菌種/菌株 特有の影響を示したことから, 大腸上皮細胞の遺伝子発現に対しては, 有機酸以外の代謝産物あるいは因子の関与が推定された.

一般演題 18

ビフィズス菌-大腸菌シャトルベクターを用いた
ヒト腸管由来ビフィズス菌の形質転換Construction of *Escherichia coli*-*Bifidobacterium* Shuttle Vector and
Transformation of Human Intestinal Bifidobacterial Strains○村井 牧¹, 伊藤雅洋¹, 木脇真祐美², 辻 浩和², 野本康二², 岡田信彦¹, 檀原宏文¹¹北里大学薬学部微生物学教室, ²ヤクルト中央研究所

【目的】近年いくつかの *Bifidobacterium* 菌種で完全長ゲノム配列が公開された。しかしながら, *Bifidobacterium* の腸内における働きに關与する遺伝子の多くは依然明らかとなっていない。一般に, 機能遺伝子の同定・解明にはランダム変異株ライブラリーの利用が有効であるが, *Bifidobacterium* では相同組換え法等によるランダム変異導入のための効率の高い遺伝子導入法が確立されていない。そこで, 我々は, *Bifidobacterium* におけるランダム変異導入を目的として, まず *Bifidobacterium* における実用的な遺伝子導入法の確立を試みた。

【方法】 *Enterococcus faecalis* 由来のスペクチノマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとし, 大腸菌ベクター-pUC19 由来の複製領域および *B. breve* プラスミド pNBb1 由来の複製領域よりなるビフィズス菌-大腸菌シャトルベクター (pBDSNBb1F) を作製した。この pBDSNBb1F を用い, ヒト腸管由来の *B. adolescentis* および *B. longum* subsp. *infantis* それぞれ3株を宿主として, エレクトロポレーション法により形質転換を行った。

【結果と考察】 *B. adolescentis* および *B. longum* subsp. *infantis* それぞれ2株において pBDSNBb1F の高効率な形質転換が認められた。特に, *B. longum* subsp. *infantis* における形質転換効率は非常に高効率 (10^8 CFU/ μ g DNA) であり, 本菌株を用いたランダム変異導入法の確立が期待される。現在更なる形質転換の高効率化を目指し, エレクトロポレーション条件の検討を行っている。

一般演題 19

*Lactobacillus*におけるランダム変異株作製法の確立A Random Mutagenesis System for probiotic *Lactobacillus casei*
Using Tn5 Transposition Complexes

○伊藤雅洋¹, 金倫基^{1,3}, 辻浩和², 木脇真祐美², 野本康二², 村井牧¹, 岡田信彦¹, 檀原宏文¹

¹北里大学薬学部微生物学教室, ²ヤクルト中央研究所,

³Department of Pathology, University of Michigan Medical School

【目的】*Lactobacillus*の機能遺伝子を同定・解明するため, *L. casei* ATCC 27139におけるTn5 transposome (Tn5 transposonと転位酵素複合体)を用いたランダム変異株作製法を確立し, transposon挿入変異株ライブラリーの構築を試みた。

【方法】*L. casei* ATCC 27139においてプラスミド pUCYIT356-1-Not2を用いた形質転換株作製条件(菌体培養時間, エレクトロコンピテントセル濃度など)およびTn5 transposomeを用いた変異株作製条件(transposon DNA濃度, Tn5 transposome量)を最適化した。得られたtransposon挿入変異株について, 栄養要求性変異株を選出し, transposon挿入部位を同定した。

【結果と考察】上記形質転換株作製条件を最適化し, プラスミドの形質転換効率を 3.0×10^8 CFU/ μ g DNAまで向上させた。次に, 変異株作製条件を最適化し1回のエレクトロポレーションあたり60 CFUのtransposon挿入変異株の取得を可能にした。変異株作製を繰り返し行い, これまでに9,408株の変異株ライブラリーを作製した。transposon挿入変異株3,264株より選出された栄養要求性変異株6株において, transposonはランダムに1カ所のみ挿入され, ホットスポットは存在しないことが強く示唆された。これらの結果から, *Lactobacillus*においてtransposon挿入変異株ライブラリーの作製は可能であること, また, 今回作製された変異株ライブラリーは*Lactobacillus*の遺伝子制御や代謝メカニズムを明らかにするうえで有用であることが示唆された。

一般演題 20

発現遺伝子情報に基づく腸内環境評価系の構築

Development of Gut Environment Assessment System Based on Gene Expression Profiling

○加藤 完^{1,2,5}, 福田真嗣^{1,2}, 伊達康博^{2,3,4}, 近山英輔⁴, 中西裕美子^{1,2}, 坪井裕理^{4,5},
守屋繁春^{1,5}, 常田 聡³, 守屋繁春^{1,5}, 菊地 淳^{1,4,6}, 大野博司^{1,2}

¹横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科, ²理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター,
³早稲田大学大学院先進理工学研究科, ⁴理化学研究所植物科学研究センター,
⁵理化学研究所基幹研究所, ⁶名古屋大学大学院生命農学研究科

【目的】近年のDNAシーケンス技術の進歩により、腸内フローラのメタゲノム解析から膨大なゲノムデータが得られているが、それらの遺伝子群が実際に腸管内でどのように機能しているかは明確でない。そこで本研究では、新たに構築したcDNAライブラリー作成法を用いてマウス腸内細菌叢の発現遺伝子群について解析を行った。さらに栄養源に伴う多様な腸内環境変動の全容を明らかにするために、発現遺伝子群情報に加えて腸内細菌叢情報および代謝物情報の変動プロファイルを組み合わせた複合オミクス解析手法も用いた三次元腸内環境評価系を構築し、検討した。

【方法】SPF環境下で飼育したBALB/cマウスに通常食と小麦ふすま由来繊維を5% (w/w) 含む高繊維食を1週間ごと交互に摂食させ、毎日糞便をサンプリングした。cDNAライブラリーは、マウス糞便より抽出した総RNAからrRNAを除去後、逆転写することで作成した。発現遺伝子プロファイルは、作成したマウス糞便より作成したcDNAライブラリーの配列情報をCOGsやKEGG, MG-RASTなどのデータベースにより解析し、植物由来繊維摂食時の腸内フローラの発現遺伝子群を評価した。腸内フローラ構成の変動は、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE法) を用いて解析を行い、代謝物の変動は核磁気共鳴法 (NMR) を用いて解析を行った。得られた発現遺伝子、細菌叢、代謝物プロファイルはそれぞれ数値化し、各データ間における多変量解析および共相関解析を行った。

【結果および考察】cDNAライブラリーにより得られた腸内フローラの発現遺伝子情報をCOGsデータベースで解析したところ、高繊維食摂食時に「Signal transduction」や「Carbohydrate metabolism」に分類される遺伝子群の増加が見られた。発現遺伝子群変動の変動プロファイルとを数値化し、(ここに発現遺伝子情報の解析結果をのせる)。宿主の健康にとって腸内環境の変動が大きな影響を及ぼすことは既知であり、宿主-腸内フローラ間相互作用の全容を知ることは健康維持や疾病の予防に重要である。高繊維食摂食に伴う細菌叢や代謝物の変動プロファイルをそれぞれ数値化し、変動の情報を加えに加えて、発現遺伝子の変動プロファイルも数値化し、それぞれに多変量解析および共相関解析を行うことで、複合的なゲノムトランスクリプトーム-メタボローム間三次元「Genome-Transcriptome-Metabolome」の三次元プロファイルを作製した。これにより解析を行うことができた。すなわち各解析により高繊維食摂食時に特徴的・特異的に変動増加した菌-発現遺伝子-代謝物情報を抽出することが可能になった。の間に関連性を持たせることが可能となり、本解析を用いることにより腸内環境変動の評価が可能であると考えられた。