

## ■ 研究概要

《内容》

### ゲノム解析

454 LifeScience 社の Genome Sequencer 20 System を用い、ラブレ菌のドラフトゲノム配列を得ました。続いて、得られた配列中に存在する遺伝子を推定し、その中に既知の病原性遺伝子と相同性のある遺伝子が含まれているかどうかを調べました。

ゲノムの長さは 2,414,775 塩基対で、2,272 個の遺伝子があることが推定されました。ラブレ菌の遺伝子と、病原性との関与が報告されている乳酸菌 (*Enterococcus* 属, *Streptococcus* 属, *Lactococcus* 属, *Lactobacillus* 属) の 386 個の遺伝子とを比較した結果、類似した遺伝子は検出されず、ラブレ菌には病原性との関与が報告されている遺伝子は存在しないことが確認されました。

### 抗生物質感受性試験

欧州 SCAN が提案する、食品に含まれる微生物の抗生物質感受性試験のガイドラインに準じ、ラブレ菌の抗生物質に対する感受性、抗生物質耐性の日和見感染菌への伝達性、さらに伝達報告のある抗生物質耐性遺伝子の有無について調査しました。

13 種類の抗生物質に対するラブレ菌の感受性を測定したところ、3 種類の抗生物質について SCAN の提案する基準値をわずかに超える耐性を確認しました。*Enterococcus* 属への接合伝達試験により、これら基準値を超えた抗生物質耐性の伝達性を確認したところ、耐性の伝達は確認されませんでした。加えて、伝達性の抗生物質耐性遺伝子の有無を調査するために、ラブレ菌のゲノム情報と抗生物質耐性遺伝子の比較を、さらに特異的 PCR を行った結果、該当する遺伝子は存在しないことが確認されました。

以上より、ラブレ菌が保有する抗生物質に対する耐性は、外部から伝達されたものではなく、かつ外部への伝達もしない事が明らかとなりました。

今までに、食経験や、in vitro 及び動物を用いた試験、ヒト試験を通して、ラブレ菌の安全性は保障されておりました。今回、新たにゲノム解析および抗生物質感受性試験により、ラブレ菌の安全性が高いことが再確認出来ました。

## ■ 用語の説明

### ラブレ菌:

学名 *Lactobacillus brevis* KB290 → 通称、Labre(ラブレ)

京都の漬物「すぐき」から(財)ルイ・パストゥール医学研究センター(京都)で分離され、その整腸作用や免疫賦活作用が研究されてきました。

### ゲノム:

生物の持つ遺伝情報の総体を指します。ウイルスなど一部の生物を除き、ほとんど全ての生物において遺伝情報は DNA と呼ばれる物質の配列に収められています。

### 遺伝子:

遺伝情報の最小単位で、各遺伝子は生命活動に必要な働きの一つを担っています。それぞれの遺伝子の働きは、遺伝情報を収めている物質である、DNA を構成する 4 種類の塩基の配列により決定されます。

### 病原性遺伝子:

微生物の遺伝子の中で、疾病を引き起こす原因として報告されている遺伝子のことを指します。

### Genome Sequencer 20 System:

米 454 Life Sciences 社によって開発された次世代型 DNA 配列解析装置のことを指します。1 台の装置で、1 時間当たり数百万塩基の配列情報を得ることができます。今までの DNA 配列解析技術と異なり、時間的あるいはコスト的な制限に縛られることなく、多くの有用な配列や複雑な領域を解読できます。

### ドラフトゲノム配列:

未解読部分を含むが、ほとんどの遺伝子が把握できる段階まで解読されたゲノム配列のことを指します。

### 抗生物質感受性試験:

抗生物質の抗菌力を表す単位として一般的に用いられている抗生物質最少阻止濃度を測定する試験のことを指します。SCAN の提案では、耐性と認められた抗生物質については、接合伝達試験による耐性の伝達性調査、および抗生物質耐性遺伝子の有無調査が要求されています。

### **日和見感染菌:**

通常、生体が健康に保たれている限り感染症の原因菌とはなりません、何らかの理由によって免疫力が衰えた状態となったときのみ感染症を引き起こしうる菌を指します。日和見感染菌の主な種として *Enterococcus faecalis* が知られています。

### **SCAN:**

the European Scientific Committee on Animal Nutrition の略称であり、欧州連合 (EU) の行政執行機関である欧州委員会のうち、動物栄養に関する委員会のことを指します。

### **抗生物質耐性:**

抗生物質とは微生物の増殖を抑えたり、死滅させたりする働きを持つ物質であり、その作用を受けない性質のことを抗生物質耐性といいます。

### **遺伝子の伝達性:**

細胞と細胞の物理的接触を介して遺伝子が元の微生物の細胞内から、他の微生物の細胞内へと移動することをいいます。

### **13 種類の抗生物質:**

SCAN では臨床上重要な以下 13 種類の抗生物質に対する感受性試験の必要性を提案しています。

アンピシリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、エリスロマイシン、キヌプリスチン/ ダルホプリスチン、バンコマイシン、トリメトプリム、シプロフロキサシン、リネゾリド、リファンピン

### **特異的 PCR:**

PCR とは DNA を大量に合成する技術のことを指します。今回、抗生物質耐性遺伝子に特異的な PCR を行いました。

### **in vitro 試験:**

試験管内の試験を指します。

## 【資料】学会発表の要旨

### *Lactobacillus brevis* KB290 のゲノム解析、および抗生物質感受性試験

深尾匡憲 1)、井上拓郎 1)、矢賀部隆史 1)、矢嶋信浩 1)、野村隆浩 2)、富田治芳 2)、谷本弘一 2)、池康嘉 2)

1)カゴメ(株)総合研究所、2)群馬大学大学院・医学系研究科・細菌感染制御学

*Lactobacillus brevis* KB290 は京都の漬物「すぐき」より分離された植物性食品由来の乳酸菌である。KB290 のプロバイオティクスとしての安全性に関する知見を得ることを目的に、ゲノム解析、および抗生物質感受性試験を行ったので報告する。

KB290 からゲノム DNA を抽出し、エマルジョン PCR とパイロシーケンス法による 454 社 Genome Sequencer 20 を用いたドラフト解析を行った。平均判読塩基長 107 bp で 815,834 リード(冗長度 35)の塩基配列を得ることができた。得られた塩基配列をアッセンブルしたところ、109 コンティグ(うち>4 kb が 63)を得て、全塩基長は 2.49 Mb と計算された。Critica および Glimmer2 を用いて ORF 検索を行ったところ、それぞれ 2,272、2,437 の推定 ORF が得られた。現在、NCBICOG データベースを用い、推定 ORF のアノテーション付けと、他の乳酸菌株との比較解析を行い、それらの結果から KB290 の安全性について評価を行っている。また、FAO/WHO 共同の食品に含まれるプロバイオティクス評価ガイドラインに準じ、KB290 の抗生物質最少阻止濃度、および抗生物質耐性遺伝子の日和見感染菌への伝達性について検討したので併せて報告する。