

発酵漬物由来乳酸菌のゲノム解析に基づく機能評価

藤井 恵輔* 飛田 啓輔*

1. はじめに

アレルギー性疾患は自己免疫疾患の一つであり、国民の半数が何らかのアレルギー性疾患に罹患していると言われている。わが国では、1963年に初めてスギ花粉患者が確認されて以来、アレルギー患者は増加の一途を辿っている。

近年、伝統的な発酵食品から分離される乳酸菌に関して、様々な健康維持機能が報告され、機能性食品として利用されている。当センターでは発酵漬物のスターターとして利用するために、発酵漬物から乳酸菌株の分離や選抜を行い、保存してきた。これらの乳酸菌株を、抗アレルギー作用を期待できる機能性食品として利用するためには、健康維持機能をはじめ、安全性や活性成分を明らかにすることが必要である。本研究では、これら乳酸菌の抗アレルギー作用について調査することを目的として実施した。

2. 目的

これまでに、当センターが保有する発酵漬物由来乳酸菌株の一部は、抗アレルギー作用を有することが、培養細胞を用いたトランスクリプトーム解析によって、推察されている¹⁾。これらの乳酸菌株について、機能性食品として利用するために、安全性や機能性を調べる必要がある。本研究では、当センターが保有する発酵漬物由来乳酸菌の特性をゲノムレベルで調査する。

3. 研究内容

3.1 乳酸菌の一塩基多型 (SNP) 解析

3.1.1 ライブラリ調整

センターが保有する異なる菌種の乳酸菌 (計 5 株) に、それぞれ Lysis Solution F (ニッポンジーン) を添加した後、Shake Master Neo (bms) を用い、1,500 rpm で 2 分間粉砕した。破砕したサンプルは、65°C で 10 分間静置した。その後、12,000 × g で 2 分間遠心分離を行い、上清を分取した。MPure-12 システムと MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio) を用い、分取した溶液から DNA を精製した。

DNA 溶液の定量測定 QuantiFluor dsDNA System と Quantus Fluorometer (Promega) を用い、DNA 溶液の濃度測定を行った。MGIEasy FS DNA Library Prep Set を用い、ライブラリを作製した。酵素切断の反応時間は 8 分間とした。また、MGIEasy DNA Adapters96 (Plate) Kit のアダプターを使用した。

Qubit 3.0 Fluorometer と dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、作製されたライブラリ溶液の濃度測定を行った。Fragment Analyzer と dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies) を用い、作製されたライブラリの品質の確認を行った。作製されたライブラリと MGIEasy Circularization Kit (MGI Tech Co. Ltd.) を用い、環状化 DNA を作製した。DNBSEQ 400RS

High-throughput Sequencing Kit (MGI Tech Co. Ltd.) を用い、DNA Nanoball (DNB) を作製した。

3.1.2 シーケンシング解析

DNBSEQ-G40 (MGI Tech Co. Ltd.) を用い、2 × 200 bp の条件で、作製された DNB をシーケンシング解析した。

3.1.3 データ解析

cutadapt でアダプター配列を除いた後、sickle を用い、クオリティスコアが 20 未満の塩基と 100 塩基に満たないペアリードを除去した。BWA を用い、フィルタリングされたリードを参照配列にマッピングを行った。picard を用い、bam 形式への変換や重複リードの除去を行った。GATK を用い、SNPs/INDELs を検出した。同定された SNPs/INDELs が、同義的置換か非同義的置換を起こすのかを snpEff を用い確認した。

3.2 乳酸菌のゲノム解析

3.2.1 ライブラリ調製

精製 DNA は、5200 Fragment Analyzer System と Agilent HS Genomic DNA 50kb Kit (Agilent Technologies) を用い、電気泳動を行い、品質の確認を行った。Short Read Eliminator XS (Circulomics) を用い、低分子除去を行った。g-TUBE (Covaris) を用い、DNA の断片が約 10-20kbp になるように断片化した。SMRTbell Express Template Prep Kit 2.0 (PacBio) を用い、Procedure & Checklist-Preparing HiFi Libraries From Low DNA Input Using SMRTbell® Express Template Prep Kit 2.0 でライブラリ調製を行った。

3.2.2 シーケンシング解析

Binding kit 2.2 (PacBio) を用い、作製されたライブラリのポリマーゼ複合体を形成し、Sequel IIe (PacBio) を用い、シーケンシングを行った。

3.2.3 データ解析

SMRT Link を用い、シーケンシングで得られた配列からアダプター配列を除去し、サブリードを形成した。そのサブリードをアライメントしたコンセンサス配列 (CCS) を作成した後、1 リードあたりの平均品質値が 20 未満の CCS リードを除去し、HiFi リードとした。Filtlong を用い、1,000 塩基以下の HiFi リードを削除した。Flye で、高品質の HiFi リードをアセンブルした。さらに、Bandage を用い、アセンブルされたコンティググラフの結果を確認した。また、Check M を用い、アセンブルされたゲノムデータの完全性を確認した。Prokka を用い、アセンブルされた配列から遺伝子を予測した。

*フード・ケミカルグループ

4. 研究結果と考察

4.1 乳酸菌の SNP 解析

異なる菌種の乳酸菌 5 株の SNP 解析を行った。乳酸菌は、同一種のゲノムデータが公開されている株を参照菌株とした。乳酸菌 5 株の参照菌株に対する遺伝子変異数および変異割合を表 1 に示す。

表 1 乳酸菌 5 株の変異数および変異割合

	参照菌株に対する 遺伝子変異数	参照菌株に対する 遺伝子変異割合
乳酸菌 (5 株)	20,847 ~ 62,582	0.64% ~ 2.63%

参照菌株に対する乳酸菌 5 株の遺伝子変異数は 20,847 個から 62,582 個であり、参照菌株に対する遺伝子変異割合は 0.64% から 2.63% と、菌株によって大きく異なることが判明した。また、参照菌株に対する乳酸菌 5 株の変異の詳細を図 1 に示す。

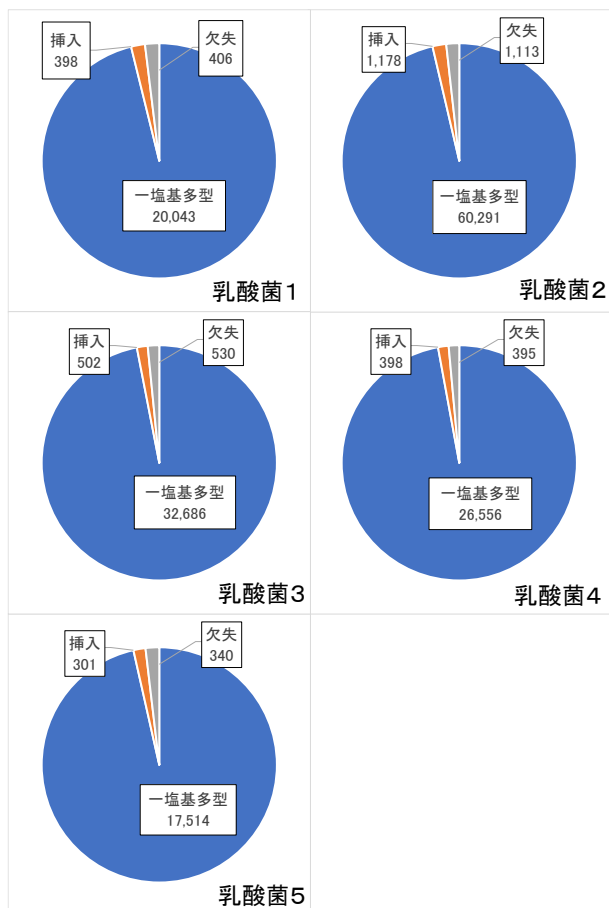


図 1 参照菌株に対する乳酸菌 5 株の変異の詳細

乳酸菌 5 株の参照菌株に対する遺伝子変異は、大半が 1 塩基多型 (1 塩基違い) であることが示唆された。

4.2 乳酸菌 3 の全ゲノム解析

先の研究において、乳酸菌 3 は抗アレルギー作用を

期待できることが推察されている¹⁾。そこで、乳酸菌 3 のゲノムの特性と安全性を調査するために全ゲノム解析を試みた。乳酸菌 3 の染色体 DNA とプラスミドのゲノムサイズを表 2 に示す。乳酸菌 3 の染色体 DNA のサイズは、2,469,963 bp (約 2.4 Mbp) であり、また、6 つのプラスミドを持つことが確認された。

表 2 乳酸菌 3 の染色体 DNA とプラスミドのサイズ

	染色体 DNA サイズ [bp]	プラスミドサイズ [bp]
乳酸菌 3	2,469,963	44,748
		36,355
		11,104
		24,233
		17,732
		14,622

4.3 乳酸菌 3 の毒性に関する遺伝子の検索

乳酸菌 3 の染色体 DNA とプラスミドのゲノム配列について、毒性に関する既知の遺伝子である、non-haemolytic enterotoxin (*nheB*)、*B. cereus* enterotoxin T (*bceT*)、enterotoxin FM (*entFM*)、sphingomyelinase (*sph*) を検索した。その結果、これらの遺伝子の配列は乳酸菌 3 の染色体 DNA とプラスミドのゲノム配列には含まれないことが確認された。

5. まとめ

- 1) 発酵漬物由来乳酸菌 5 株の SNP 解析を行い、各菌株の遺伝子変異の特性を調査した。
- 2) 発酵漬物由来乳酸菌 3 のゲノム解析を行い、保有する染色体 DNA あるいはプラスミドの個数とゲノムサイズが判明した。
- 3) 発酵漬物由来乳酸菌 3 は、検索した既知の毒性に関する遺伝子を保有しないことが確認された。

6. 今後の課題

今後は、抗アレルギー作用が期待できる機能性食品の開発のために、発酵漬物由来乳酸菌 3 について動物実験や臨床試験において抗アレルギー作用を検証することが望まれる。

なお、本研究は令和 3 年度から令和 4 年度まで文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業「機能性食品開発に資する発酵食品由来微生物に関する調査」の一環として実施したものである。

7. 参考文献等

- 1) 藤井 恵輔, 飛田 啓輔. 茨城県産業技術イノベーションセンター研究報告, 50 (2022).