

乳酸菌での *E.coli* 由来の線毛アドヒジエンタンパク質
(FimH) 遺伝子発現と融合タンパク質の機能解析

有馬 三樹子

2001

乳酸菌での *E. coli* 由来の線毛アドヒジユンタンパク質
(FimH) 遺伝子発現と融合タンパク質の機能解析

有馬 三樹子

2001

目次

| | |
|---|-----|
| 緒論 | …3 |
| 第1章 <i>E. coli</i> 由来線毛アドヒジュンタンパク質遺伝子を発現させる乳酸菌遺伝子への組み込み | |
| 目的 | …31 |
| 実験材料 | …34 |
| 実験方法 | …43 |
| 1. プロテイナーゼ <i>prtY</i> 遺伝子のプロモーター上流のシーケンス | |
| 1) Alkaline Lysis Miniprep 法によるプラスミド抽出 | …43 |
| 2) アガロースゲル電気泳動法 | …44 |
| 3) クローニング法 | …45 |
| 4) ヒートショックによる <i>E. coli</i> の形質転換法 | …46 |
| 5) カラムによるプラスミド抽出法 | …47 |
| 6) DNA シーケンス | …47 |
| 2. シャトルベクターを用いた <i>prtY</i> 遺伝子のサブクローニング | |
| 7) 染色体 DNA 抽出法 | …49 |
| 8) PCR 法 | …49 |
| 9) <i>prtY</i> 遺伝子のサブクローニング | …49 |
| 3. pY790 への <i>fimH</i> 遺伝子の組み込み | |
| 10) pY790 への <i>fimH</i> 遺伝子のクローニング | …51 |
| 結果および考察 | …52 |
| 要約 | …62 |
| 第2章 線毛アドヒジュンタンパク質を含む融合タンパク質の機能解析 | |
| 目的 | …64 |
| 実験材料 | …67 |
| 実験方法 | …71 |

| | |
|---|------|
| 1. ウェスタンブロッティング法 | |
| 1) SDS-PAGE | …71 |
| 2) ニトロセルロースメンブレンへのブロッティング | …72 |
| 3) 免疫染色 | …73 |
| 2. アドヒジュンタンパク質融合タンパク質によるヒト結腸線癌由来 Caco-2 細胞への <i>E. coli</i> の付着阻害試験 | |
| 4) 試料の調製 | …74 |
| 5) 菌体タンパク質による <i>E. coli</i> の付着阻害試験 | …75 |
| 結果および考察 | …76 |
| 要 約 | …83 |
| 第3章 構築プラスミドによる乳酸菌の形質転換と線毛アドヒジュンタンパク質を含む融合タンパク質の評価 | |
| 目 的 | …85 |
| 実験材料 | …87 |
| 実験方法 | |
| 1. 構築プラスミドによる <i>Lactobacillus casei</i> の形質転換 | |
| 1) エレクトロポレーションによる <i>L. casei</i> の形質転換 | …89 |
| 2. 乳酸菌で産生された融合タンパク質のウェスタンブロッティング法による検出 | |
| 2) ウェスタンブロッティング法 | …93 |
| 結果および考察 | …94 |
| 要 約 | …106 |
| 総 括 | …107 |
| 謝 辞 | …112 |
| 参考文献 | …113 |

緒 論

乳酸菌は、糖類を発酵し、多量の乳酸を生産する細菌の総称である。乳酸菌の定義は、①グラム陽性であること、②細胞形態は桿菌または球菌であること、③カタラーゼ反応は陰性であること、④消費したグルコースに対し、50%以上の乳酸を産生すること、⑤内性胞子は形成しないこと、⑥運動性は示さないこと（まれに示すものもある）である¹⁾。乳酸菌は古くから人間の食生活に深く関係しており、保存性の高い乳製品に加工するための基本的な手段の一つとして乳酸発酵を利用し、また種々の漬物や発酵調味料などに良い味や香りをつけるためにも、乳酸菌の関与が必要であると考えられる。

一方、乳酸菌を食品に利用するだけでなく、その機能性を研究することによって、人体に良い効果を与えることが明らかにされてきた。乳酸菌が Pasteur によって発見されて、その後、乳酸菌の分類がなされ、代謝系、遺伝子レベルまで研究が進展したのは、ここ 100 年余りのことである¹⁾が、近年では乳酸菌の生体での挙動や栄養・生理効果などが報告されている。特に腸管内に生息する乳酸菌は、腸内細菌叢を維持・改善し、有害な細菌の増殖を阻止、あるいは腸管の免疫機能を賦活化するなど、宿主の健康に深くかかわっていることが明らかになってきている。さらに乳酸菌体成分または発酵生産物の生理効果、ならびに生きている乳酸菌が発揮する生理効果についても、国内外で活発な研究が展開されている（表 1）²⁾。特に、宿主の整腸作用とともに、免疫賦活、抗腫瘍性、抗変異原性、血清コレステロール低下作用、血圧低下作用など、宿主の生体防御機構を活性化する効果が注目を集めている。このため、乳酸菌は食品として利用されるだけでなく、医薬品としての開発の対象ともなっている。

現在、注目されているその生理効果に関する乳酸菌の研究として、プロバイオティクスに関わる内容があげられる。近年、人畜の疾病治療薬や家

表 1. 発酵乳・乳酸菌の栄養・生理効果についての主な研究²⁾

| 効果 | 機序 | 乳酸菌の作用 |
|-----------|---|---|
| 栄養増強・寿命延長 | 栄養価の改善・吸収促進 | タンパク質分解酵素によるタンパク質の予備消化・代謝活性・ミネラル吸収促進・ビタミン生成能 |
| 乳糖不耐症改善 | 乳糖分解酵素による乳糖分解 | |
| 感染防御 | 整腸効果 腸内フローラの改善 有害細菌の抑制 胃中での有害細菌の抑制 | 抗菌物質産生能 菌体と腸管との親和性 菌体構成成分による抑制・乳酸産生によるpH低下 <i>Helicobacter pylori</i> の胃粘膜への付着抑制 |
| 制癌 | 有害代謝活性の抑制 抗変異原性 免疫賦活 | 菌体構成成分（多糖類・菌体壁成分）による抑制 細胞表面構造への変異原物質の吸着 マクロファージ活性化 |
| 循環器病防止 | 血中コレステロール低減 血圧降下 | コレステロールの合成阻害・吸収阻害・排泄促進 アンジオテンシン変換酵素阻害 |

畜の成長促進剤，または治療薬として多種の抗生物質が使用されている。しかし，多量かつ慢性的に無秩序な人畜への抗生物質の投与は，生体への蓄積や耐性菌の出現をもたらす結果となっている。そこで，抗生物質に代わるものとして生菌剤，すなわちプロバイオティクスの考え方が注目されている。プロバイオティクスという言葉は，Fuller³⁾ が示した「腸内微生物のバランスを改善することによって宿主動物に有用に働く微生物製剤（添加物）」という定義が広く用いられている。この定義はプロバイオティクスが活着している微生物菌体であることを強調しており，抗生物質などの物質との区別をはっきりさせている。プロバイオティクス乳酸菌の使用目的としては，便秘や下痢の予防，消化吸収の改善，血清コレステロール低下などがあげられる。さらに積極的な医療分野における保健行為として，病気の予防および治療の促進など，医療補助剤としてプロバイオティクス乳酸菌はすでに使用されている⁴⁾。ヨーロッパではプロバイオティクスをキーワードにした研究は盛んに行なわれており，さらに発酵乳の人の健康への寄与とともに，乳酸菌そのものがもつ生理効果の可能性の検索とその検証が乳酸菌研究を推進している⁵⁾。

プロバイオティクス乳酸菌による腸内細菌叢の改善などから，病原性細菌による感染の予防としての役割を果たしていると考えられるが，その機構は明確に報告されていない。病原性細菌の付着機構の特徴から，プロバイオティクス乳酸菌の付着部位の競合による感染症の予防の可能性について考えると，腸管上皮細胞へのそれぞれの付着機構が重要になる。

病原性細菌が宿主細胞へ付着する際に考えられる因子は，すでに明らかにされているものが多く，菌体表層に存在する線毛やレクチン様タンパク質，S-layer タンパク質およびリポタイコ酸であり，宿主細胞のレセプターとして，糖タンパク質，糖脂質および細胞外マトリックスタンパク質が報

告されている⁶⁾。本論文中では、病原性細菌の付着因子をアドヒジュンタンパク質と表し、乳酸菌の付着因子はこれと区別するために、単に付着因子と表した。乳酸菌の付着機構については後述するが、病原性細菌の付着について、特に医学方面でよく研究されている⁷⁾。ヒトに対して感染症を引き起こす細菌は、細菌をはじめ、真菌、クラミジア、リケッチア、ウイルス、原虫、寄生虫、あるいは節足動物などさまざまなものがある。これらの細菌のうち多くはヒトと共存しているが、宿主の防御能（免疫能）や細菌の病原性（毒力）のバランスが崩れたり、あるいは何かの外的要因が加わったときに感染症（発病）に至る。その感染経路は、空気・飛沫・接触・一般媒介物・昆虫に分けられ、食中毒などの病原性細菌の感染経路は、接触・一般媒介物感染によるものが多い⁸⁾。その病原性細菌による感染症は、生体内に侵入した原因細菌が感染局所に到達し、そこで定着した後、細胞への侵入因子や毒素を産生することによって、症状として現れることで感染が成立する。定着とは、感染局所に到達した細菌が、目的とする宿主細胞に付着し、増殖することである。したがって、感染の成立に最も重要な最初のステップが付着である⁹⁾。病原性細菌は、主として線毛によって自らの細胞と宿主の上皮細胞表面への付着を可能にしている。線毛が特異的に粘膜上皮に付着することにより、宿主の腸管蠕動運動、排尿、上部呼吸器における排除機能などに対抗している。病原性細菌がもつ各線毛の付着因子であるアドヒジュンタンパク質が認識し宿主の細胞表面に存在するレセプターは、糖鎖であることがわかっている。

一般的な細菌に対する血清学的反応の一つである赤血球凝集反応を用いて、病原性細菌を試験すると、赤血球を凝集させるものがある。これは、細菌がもつ線毛が、赤血球の細胞表面に存在するマンノースに反応し、凝集する mannose-sensitive (MS) 線毛であるためである。この線毛はマンノ

ースを認識し、マンノースを含む糖鎖と結合し、細菌と赤血球と凝集を起こす。これに対し、マンノースを認識しない線毛は、mannose-resistance(MR)線毛と呼ばれ、上記のどちらかに大きく分類できる。さらに、現在では病原性細菌の線毛についてはかなり明らかにされてきており、いずれも付着する宿主の細胞表面に存在する様々な糖鎖を認識することがわかってきている(表2)¹⁰⁾。また、病原性細菌の付着だけでなく、毒素産生菌が産生する毒素も宿主の細胞表面にある糖鎖をレセプターとして認識していることが知られている(表3)¹⁰⁾。認識する糖鎖の相違は、線毛の重要な性質(付着特異性)であるので、この違いにより表2のように分類することができ、これらの定着因子が下痢発症に重要な役割を果たしていることを示す研究がいくつか報告されている^{11,12)}。

具体的にブタを使った実験¹¹⁾において、アドヒジュンタンパク質であるK88と下痢原因毒素産生能の両者を有する毒素原性*E. coli* (enterotocigenic *E. coli* : ETEC) を子ブタに投与した場合、9匹中8匹が下痢を発症することを確認したが、毒素産生能を保有しK88を持たない菌株を5匹に投与しても、下痢を起こさないことが確認された。また、易熱性エンテロトキシン(LT)毒素を産生(LT(+))し、アドヒジュンタンパク質である colonization factor antigen : CFA/Iをもつ(CFA/I(+)) ETECのヒト有志者への投与実験¹²⁾では、LT(+)でCFA/I(+)の菌株を6人に投与した場合、すべてのヒトが下痢を発症したにもかかわらず、LT(+)でCFA/I(-)の菌株を6人に投与しても誰も下痢を発症しなかったと報告されている。これらの実験で用いられたETECは、同じ菌種であるが、菌株によってアドヒジュンタンパク質が異なり¹³⁾、特異的な宿主となる動物の腸管内に付着し定着する。このことから、アドヒジュンタンパク質によって宿主の細胞表面へ付着することが感染の重要なステップと考えられる。

表2. 菌体が認識するレセプターの糖鎖構造とそのエピトープ¹⁰⁾

| Microbiol adhesion | Target tissue | Proposed specificity |
|-------------------------------------|--------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| Type 1 adhesion | Urinary (human) | <u>Man α</u> |
| P adhesion | Urinary (human) | <u>Gal α 1-4Gal β 1-4Glc-Cer</u> GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc-Cer |
| G adhesion | Urinary (human) | <u>GlcNAc</u> |
| S adhesion | Urinary (human) | <u>NeuAc α 2-3Gal β</u> |
| F adhesion | Urinary (human) | <u>GalNAc α 1-3GalNAc β</u> |
| K99 adhesion | Small intestine | <u>NeuGc α 2-3Gal β 1-4Glc-Cerh</u> |
| <i>Propionibacterium granulosum</i> | Small intestine | <u>Gal β 1-4Glc-Cerh</u> |
| | Skin | <u>Gal α 1-3Gal β 1-4Glc-Cer</u> GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer |
| | | <u>Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer</u> |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | Urinary | <u>Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer</u> |
| <i>Staphylococcus pneumoniae</i> | Respiratory | <u>GlcNAc β 1-3Gal β</u> Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer |
| | | |
| <i>Actinomyces naesundii</i> | Mouth | <u>Gal β</u> <u>GalNAc β</u> <u>Gal β 1-3GalNAc β 1-4GalGlc-Cer</u> 3-2 α NeuAc <u>GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc-Cer</u> |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Respiratory | <u>GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc-Cer</u> <u>Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc-β 1-4Glc-Cer</u> |
| | | |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Genital | <u>Gal β 1-4Glc β-Cerh</u> Neu5Ac2-3Gal β 1-4GlcNAc Gal α 1-Gal β 1-4Glc-Cerh GalNAc β 1-Gal β 1-4Glc-Cer Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc-Cer |
| | | |
| | | |
| | | |
| <i>Helicobacter pylori</i> | Stomach, Intestine | <u>Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer</u> |

*糖鎖の略語

Fuc : fucose, Gal : galactose, GalNAc : N-acetylgalactosamine, Glc : glucose, Man : mannose, GlcA : glucuronic acid, GluN : glucosamine, GlcNAc : N-acetylglucosamine, NeuAc : N-acetylneuraminic acid, NeuGc : N-glycorylneuraminic acid, Cer : ceramide.
下線部 : エピトープ (菌体が認識する部分) .

表3. 細菌毒素が結合する糖脂質¹⁰⁾

| 細菌 | 毒素 | 標的組織 | 糖脂質の構造 (略号) |
|--|--|--------------------|---|
| コレラ菌 (<i>Vibrio cholerae</i>) | コレラ毒素 | 小腸 | Gal β 1-3GalNAc β 1-4 Gal β 1-4Glc-Cer (G _{M1}) 3 NeuAc α 2 |
| 大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) | 大腸菌易熱性毒素 | 小腸 | Gal β 1-3GalNAc β 1-4 Gal β 1-4Glc-Cer (G _{M1}) 3 |
| 破傷風菌 (<i>Clostridium tetani</i>) | 破傷風毒 | 神経シナプス膜 | NeuAc α 2 Gal β 1-3GalNAc β 1-4 Gal β 1-4Glc-Cer (G _{D1b}) 3 |
| ボツリヌス菌 (<i>Clostridium botulinum</i>) | ボツリヌス毒素 A型, E型 | 神経シナプス膜 | NeuAc α 2-8NeuAc α 2 Gal β 1-3GalNAc β 1-4 Gal β 1-4Glc-Cer (G _{Q1b}) 3 |
| ウエルシユ菌 (<i>Clostridium perfringens</i>) | ボツリヌス毒素 B型, C型, F型 クロストリジウム δ 毒素 | 神経シナプス膜 細胞 (融解) | NeuAc α 2-8NeuAc α 2 Gal β 1-3GalNAc β 1-4 Gal β 1-4Glc-Cer (G _{T1b}) 3 NeuAc α 2 NeuAc α 2-8NeuAc α 2 GalNAc β 1-4 Gal β 1-4Glc-Cer (G _{M2}) 3 |
| 志賀赤痢菌 (<i>Shigella dysenteriae</i>) | 志賀毒素 | 大腸 | NeuAc α 2 Gal α 1-4Gal β -Cer (G ₂ Cer) Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -Cer (G ₆₃ Cer) GlcNAc β 1-4GlcNAc-ペプチド |
| 大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) | 大腸菌ベロ毒素 | 小腸 | Gal α 1-4Gal β -Cer (G ₂ Cer) Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -Cer (G ₆₃ Cer) |

糖鎖の略語については表2を参照。

線毛アドヒジュンタンパク質についてよく研究されている病原性細菌の中で、*E. coli* や *Salmonella* は Type 1 線毛を有し、前述の MS 線毛に分類される。この Type 1 線毛をもつ *E. coli* は、ヒト尿路感染症の原因菌であることが知られており¹⁴⁾、Type 1 線毛遺伝子はクローン化され DNA シーケンスが決定されている¹⁵⁾。この Type 1 線毛遺伝子は、8つの遺伝子がクラスターとなって約 9 kb の DNA 上に存在している (図 1-A)。Type 1 線毛遺伝子全体で線毛を構成するタンパク質をそれぞれ生成し、*E. coli* の菌体細胞外膜に線毛を形成する (図 1-B)。その線毛の先端に、宿主の細胞表面のマンノースを認識する FimH タンパク質が存在し、アドヒジュンタンパク質として機能している。その FimH タンパク質をコードしているのが、最も下流にコードされた *fimH* 遺伝子 (約 0.9 kb) である。また、*Salmonella* も Type 1 線毛をもつためマンノースを認識する機能は同じであるが、それをコードする遺伝子のホモロジー (相同性) がまったく異なる¹⁶⁾。

付着性に関与している宿主の細胞膜表面に存在する糖鎖について、詳細に研究されており、以下のようなことがわかっている¹⁷⁾。細胞膜にはさまざまな糖鎖が存在するが、それぞれ結合様式によって次のような構造をとっている (図 2-A)¹⁸⁾。

① 糖タンパク質 : Asn 型糖タンパク質

ムチン型糖タンパク質

② プロテオグリカン

③ 糖脂質 : スフィンゴ糖脂質 (動物界)

グリセロ糖脂質 (植物・微生物界)

生体内でのこれらの糖鎖の分布を糖鎖工学からの視点でとらえると、ヒトをはじめ、多くの哺乳動物の細胞表面膜や血清などのタンパク質はほとんどすべてが糖タンパク質であり、抗体、レセプター、ホルモン、酵素もそ

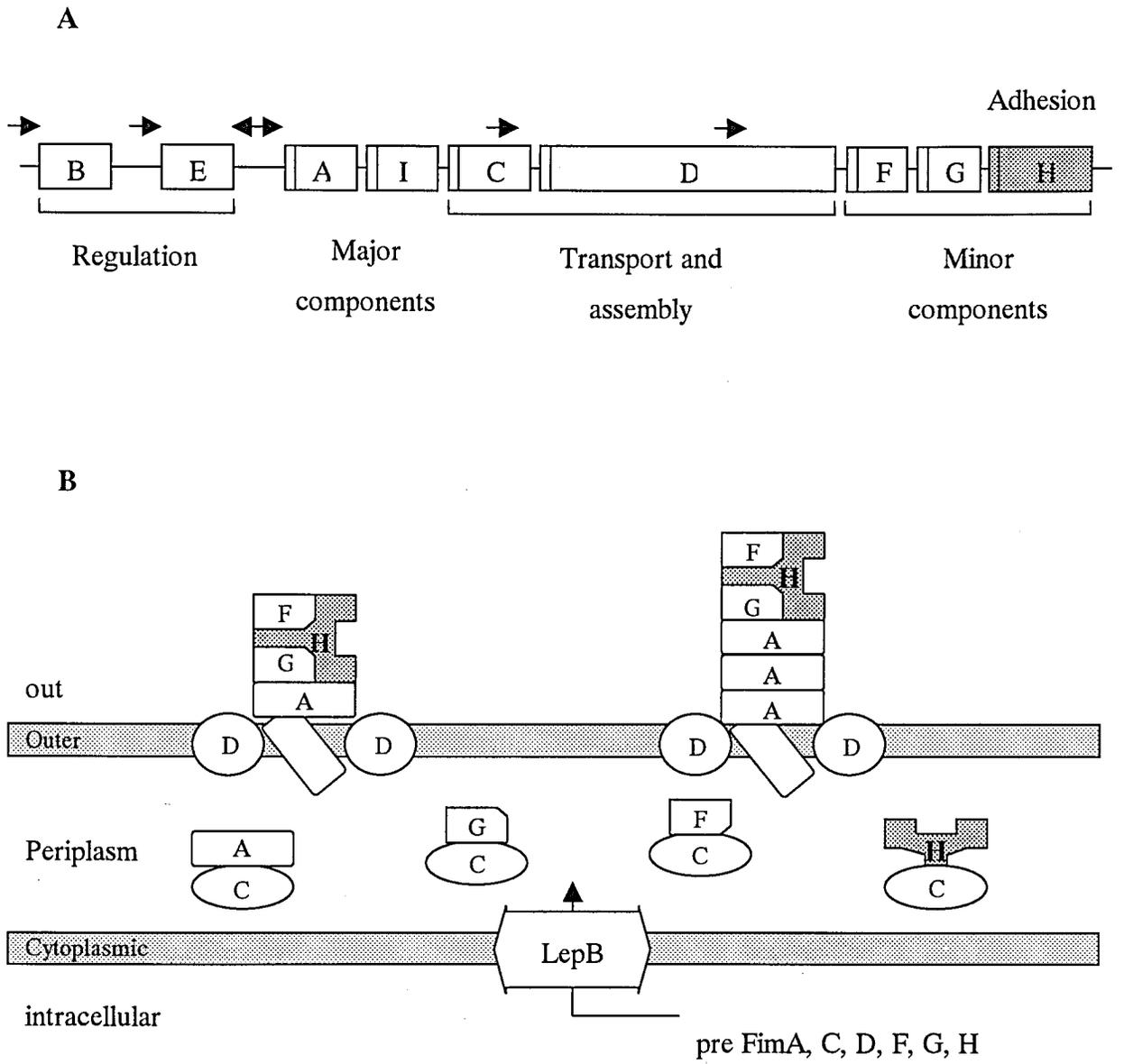


図 1. *E. coli* 由来 Type 1 線毛

A : Type 1 線毛遺伝子

B : 線毛構造モデル図

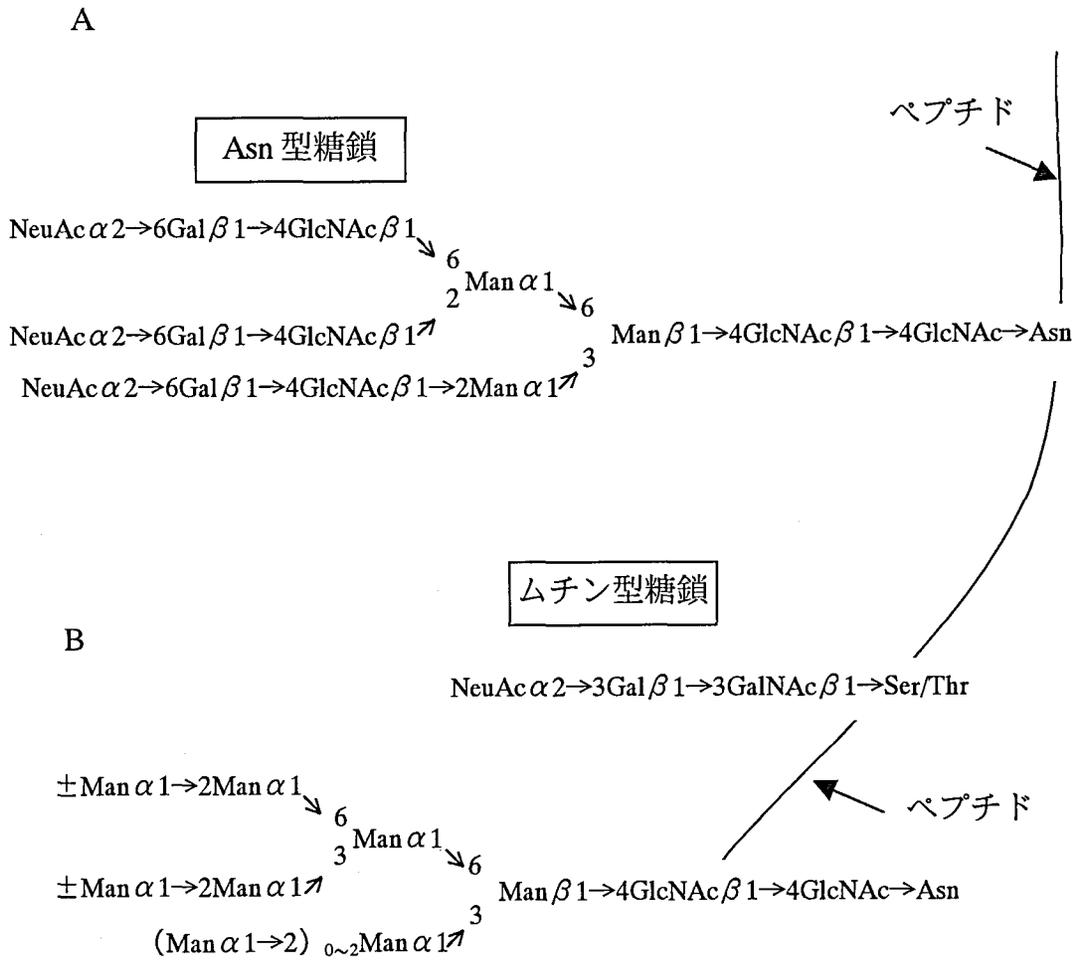


図2. 糖タンパク質糖鎖モデル図¹⁸⁾

A : 糖タンパク質の二大グループ

B : 高マンノース型 Asn 型糖鎖

(Type 1 線毛のレセプター)

の実態は単純タンパク質ではなく糖タンパク質であるものが多いと言われている。実際に、免疫グロブリンは体液性免疫の主役をなす糖タンパク質であるが、いくつかある免疫グロブリンのうち、IgA については糖鎖が細菌との結合に関与していることが示されている¹⁹⁾。IgA は気管分泌液などの分泌液中に存在し、粘膜表面における局所免疫機構をつかさどっている。この機構は、一般には細菌やウイルスの表面に存在する抗原に対し特異的な IgA が産生され、それに伴う抗原抗体反応によって感染を防御していると考えられている。

Type 1 線毛が認識するマンノースは、アスパラギン結合型の糖タンパク質（高マンノース型、図 2-B）として存在するが、高等動物の糖脂質には存在しない。したがって、マンノースをレセプターとする *E. coli* の付着には、糖脂質は関与していないと考えられる。また、病原性細菌の線毛や毒素は、糖鎖構造の中程にある配列をも認識することが知られている。前述した IgA への付着性を検討した報告¹⁹⁾でも、IgA の種類によって、その付着強度が異なることがわかっており、これは、IgA がもつ糖鎖にいくつか種類があることが示唆される。また、*Salmonella* の中で Type 1 線毛をもつものは、*E. coli* のように尿路への定着性はみられず、腸管上皮細胞や肝細胞への定着性が強いことが知られている²⁰⁾。これは両細菌とも宿主の細胞表面のマンノースを認識するが、このマンノースが結合するタンパク質構造が、生体内の組織により相違があり、その異なった構造全体を線毛が認識するため、上記のような現況がみられると考えられている²¹⁾。また、結果的に同じものをレセプターとしてもその付着強度に違いがみられることが推測される。

もう一方の糖タンパク質であるムチン型糖タンパク質は、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) がセリンやトレオニンの水酸機に結合している糖

鎖の総称であり、O-グリカン型糖鎖に属する粘液性の糖タンパク質²²⁾で、これらの性質として次の3つの機能があげられる。

I. 糖タンパク質を分泌している粘膜表面を覆って、その表面を滑らかに保つ機能があり、含水性の非常に高い糖鎖がタンパク質上に高密度に存在する構造をとっている。

II. このような構造では同時に様々な構造の糖鎖をもつことが可能となり、たとえば消化管内膜を様々な消化酵素から保護する役割を果たしている。糖鎖構造が多様であればあるほど、それらがすべての消化酵素によって分解されてしまう可能性は低くなるからである。

III. 多様な構造によって、様々な細菌感染を防ぐ役割を果たしている。細菌の大部分には菌体表面に糖鎖を認識するタンパク質であるレクチンが存在しており、細菌はレクチンを介してムチン型糖鎖に結合する。糖鎖が多様であるほど、糖結合特異性の異なる多くのレクチンに対して結合部位を提供し得るものであり、それだけ多種類の細菌がムチン型糖鎖に結合できる。

また糖タンパク質とは別に、糖鎖が結合している糖脂質も細菌、植物、動物界にわたる広い分布を示す成分であり、特に動物界のそれはスフィンゴ糖脂質の形で動物の細胞膜上に存在するものが中心であると考えられている。糖タンパク質の糖鎖そのものは上述の糖タンパク質の糖鎖と共通する点が少ないものの、糖鎖が結合するコア分子はまったく異質であり、これが糖脂質の分布特性を決める要因になると共に、糖鎖の機能にも大きく影響している²³⁾。

糖脂質は、由来する組織の違いでセラミド部分の水酸基の数が異なり、たとえば赤血球膜に由来するものには水酸基が少ないが、上皮細胞のものには多い。病原性細菌や乳酸菌は腸管上皮細胞で増殖するが、病原性細菌

が糖鎖にのみ特異性を示すと仮定すると、上皮細胞のみならず赤血球にも結合してしまい、腸管上皮への定着の効率は悪くなる。このことから、細菌の腸管上皮細胞に定着するのに適したレセプターを考えると、糖タンパク質には存在せず、糖脂質に普遍的に存在する糖鎖配列を有し、高度に水酸化されたセラミド構造を有するほうが効果的である。

ここまで病原性細菌の付着性について述べてきたが、次に、乳酸菌の腸管内での付着性について記述する。乳酸菌は線毛がなく、上記病原性細菌のような付着機構を有していないため、違った角度からのヒト腸管細胞への付着機能に関する研究がなされてきた。最近では、プロバイオティクス乳酸菌としてヒト腸管でフローラを形成する乳酸菌と病原性細菌の間での付着部位の競合による感染症予防の可能性を探る観点から、ヒト腸管上皮への乳酸菌の付着性や付着因子に関して検討されている。

乳酸菌の付着性については、さまざまな動物由来の細胞を用いて研究されており、表4に示したとおり、としてバイオプシー^{24, 25)}、手術により得られた大腸や小腸細胞^{26, 27)}、固定化大腸上皮切片²⁸⁾、固定化大腸粘液²⁸⁾、培養細胞（ヒト結腸線癌由来 Caco-2²⁹⁻³¹⁾、HT29-MTX³⁰⁾、胎児小腸由来 Intestine 407³¹⁾）、や糖脂質³²⁾などを用いて調べられている。また、乳酸菌の付着性については、赤血球凝集反応の阻害活性、糖脂質への結合試験（表5）によって研究されてきた。Yamamoto *et al.*³⁴⁾ や Mukai *et al.*^{6, 36)} は、乳酸菌の表層に存在する糖鎖結合タンパク質または S-layer タンパク質が付着性に関与していると報告している。また、斎藤ら⁴⁵⁾の研究でムチン糖鎖への乳酸菌の結合が報告されていることから、乳酸菌もまた、宿主の細胞表面の糖鎖をレセプターとして付着していることが推測される。

乳酸菌の腸管内への付着性のメカニズムを解明することは、プロバイオティクスとしての乳酸菌の有用性を考察する上で重要である。乳酸菌が宿

表 4. 乳酸菌の付着性に関する研究

| 研究対象 | 参考文献 |
|--|--|
| Human intestinal cell lines | FHs 74Int Kleeman and Klaenhammer (1982) ³²⁾ Caco-2 Elo <i>et al.</i> (1991) ²⁹⁾ HT-29-MTX Coconnier <i>et al.</i> (1992) ³¹⁾ |
| Intestinal mucosa obtained by biopsies after bacterial administration | Johansson <i>et al.</i> (1993) ²⁴⁾ |
| Human intestinal cell lines | Intestine 407 Sarem <i>et al.</i> (1996) ³³⁾ |
| Colonic or ileal cells | Adlerberth <i>et al.</i> (1996) ²⁶⁾ |
| Colonic musus layer and epithelium | Takahashi <i>et al.</i> (1996) ²⁸⁾ |
| TLC overlay assays to glycolopids | Yamamoto <i>et al.</i> (1996) ³⁴⁾ |
| Intestinal mucosa obtained by biopsies after bacterial administration | Alander <i>et al.</i> (1997) ²⁵⁾ |
| Human intestinal cell lines | MKN45 Kabir <i>et al.</i> (1997) ³⁵⁾ Caco-2 Lee <i>et al.</i> (2000) ³⁰⁾ |

表 5. *Lactobacilli* の付着因子に関する報告

| 菌種 | 菌体表面成分 | 付着試験に用いた細胞 | 糖鎖構造 | 参考文献 |
|--|--|---|--|--|
| <i>L. fermentum</i> 737 | Secreted bridging protein | Mouse stomach squamous | | Conway and Kjelleberg (1989) ³⁷⁾ |
| <i>L. acidophilus</i> LB | Secreted bridging protein | Caco-2 | | Chauviere <i>et al.</i> (1992) ³⁸⁾ |
| <i>L. acidophilus</i> BF2FO4 | Polysaccharide and secreted bridging protein | Caco-2 | | Coconnier <i>et al.</i> (1992) ³¹⁾ |
| <i>L. fermentum</i> 104-S | Saccharide | Porcine squamous epithelium | | Henriksson and Conway (1992) ³⁹⁾ |
| <i>L. acidophilus</i> JCM1132 | 60kDa and 43kDa glycoproteins | Chicken small intestine | β -Galactoside-specific lectin | Mukai and Arihara (1994) ³⁶⁾ |
| <i>L. acidophilus</i> JCM1034 | 41kDa lectin | Sheep erythrocytes | NeuAc α 2-6Gal/ β 1-4GlcNAc | Yamada <i>et al.</i> (1994) ⁴⁰⁾ |
| <i>L. acidophilus</i> LA1 | Secreted bridging protein | Epithelium Caco-2 | | Bernet <i>et al.</i> (1994) ⁴¹⁾ |
| <i>L. plantarum</i> 299 and 10 other strains | Protein | HT-29 cells | α -mannoside | Adlerberth <i>et al.</i> (1996) ²⁶⁾ |
| <i>L. fermentum</i> 104R | Secreted bridging protein | Immobilized mucus from piglet small intestine | | Rojas and Conway (1996) ⁴²⁾ |
| <i>L. casei</i> IFO 3425 | 6-phospho- β -galactosidase | Intestine TLC | Glycolipid (G _{AI}) | Yamamoto <i>et al.</i> (1996) ³⁴⁾ |
| <i>L. acidophilus</i> JCM1131 and 34 other strains | Lectin-like protein | Rat colonic mucin | Glycoprotein* | Matsumura <i>et al.</i> (1999) ⁴³⁾ |
| <i>L. johnsonii</i> La1 | | Glycolipid TLC, Caco-2 | Glycolipid (Asialo-G _{MI}) | Neesser <i>et al.</i> (2000) ⁴⁴⁾ |

*³⁾ Glycoprotein : GalNAc α 1-3-Gal/ β 1-3-[Fuc α 1-2]-GlcNAc/ β 1-3-Gal/ β 1-4-GlcNAc/ β 1-3-3-[NeuAc α 2-6]-GalNAc-Thr/Ser

主の細胞表面の糖鎖に付着することで立体障害となり、病原性細菌が付着する糖鎖のある部位がさえぎられることにより、病原性細菌の付着を競合阻害することも考えられる。しかし、各種細菌が付着機構の相違によって棲み分けをしてきたと推測すると、表面積の広いヒト腸管において、乳酸菌と病原性細菌がそれぞれ異なった糖鎖を認識した場合、付着競合阻害が起こることは考えがたい。たとえば、*E. coli* と *Salmonella* は、同じマンノースを認識しながらも、付着部位（組織）を違って生息することで、競合していないと推測される。

以上のことから、積極的に病原性細菌による感染症を予防するためには、乳酸菌が宿主の細胞表面の病原性細菌と同じレセプターに付着し、病原性細菌との付着競合阻害を起こすほうが効果的と考えられる。まず一つの考え方として、天然あるいは合成したレセプターである糖鎖を生体に投与すれば、病原性細菌のレクチンに結合することで、競合的な付着阻害を引き起こすことが期待できる。しかしながら、糖鎖は一般に、体内で速やかに代謝されてしまうので持続的な効果は期待できない。もう一つの方法として、病原性細菌の糖鎖結合部位と同様のレクチンを作成し、先にその認識する糖鎖をブロックしておく、あるいは強い親和性によって置換することである。

本研究では、乳酸菌において、病原性細菌のアドヒジュンタンパク質を発現させ、効率のよい感染防御系の構築を目指した。まず、病原性細菌の付着についての機能や性質がよく研究されている *E. coli* の Type 1 線毛のアドヒジュンタンパク質をコードした *fimH* 遺伝子を用い、乳酸菌でこの遺伝子の発現を試みた。*fimH* 遺伝子は線毛全体をコードした線毛遺伝子の最下流に存在し、*fimH* 遺伝子だけを発現させても線毛としては形成されない。*E. coli* の Type 1 線毛を図 2 に示したが、まず菌体内でそれぞれの構成タン

パク質が生産されて、細胞内膜を通過し、ペリプラズムに移行する。ここでペリプラズムに移行したタンパク質は、シャペロンタンパク質と結合し、細胞外膜へと移行する。細胞外膜に到達した構成タンパク質が、細胞外膜から菌体外へ出て、細長い線毛を形成し、細胞表面に線毛を突き出すこととなる。これらは *E. coli* における線毛形成の様子であり、乳酸菌において線毛と同じタンパク質が産生されても、乳酸菌はグラム陽性細菌で細胞膜構造が異なるために、線毛としての機能が発揮されない（菌体表層に固定されない）と考えられる。そこでアドヒジュンタンパク質のみを乳酸菌で産生し、乳酸菌の菌体外への分泌させることを考えたが、そのために菌体内のタンパク質を放出させるシグナルペプチドが必要である（図3）。*fimH* 遺伝子には *E. coli* の菌体細胞内膜を認識するシグナルペプチドをコードしているシグナル配列が存在するが、乳酸菌の菌体内においてこのシグナルペプチドは機能せず、すなわち FimH タンパク質は産生されても、菌体外へ移行することはできない（図3-A）。そこで、乳酸菌のシグナルペプチドと同時に FimH タンパク質を産生させると、乳酸菌の菌体細胞膜および細胞壁を通過することができるようになる（図3-B）。FimH タンパク質が菌体外へ通過しても、細胞壁に固定されないと、菌体外へ分泌されてしまう。そこで、乳酸菌の細胞壁にタンパク質を固定するようアンカータンパク質によって、乳酸菌の菌体外へ通過した FimH タンパク質を細胞壁へ固定する（図3-C）ことがを試みた。すなわち乳酸菌が FimH タンパク質を菌体外に放出するシグナルペプチドと同タンパク質を菌体表層に固定するアンカータンパク質をコードした遺伝子を用いてプラスミドを構築し、アドヒジュンタンパク質である FimH タンパク質の機能をもつ融合タンパク質を産生させる系を考案した。

本実験で用いた乳酸菌のシグナル配列とアンカー配列は、 *Lactobacillus*

helveticus CP790 のプロティナーゼ (*prtY*) 遺伝子 (図 4, Yamamoto *et al.*⁴⁶⁾) 由来のものである。遊離アミノ酸量が少ない牛乳中で乳酸菌が生育する上で、乳酸菌がタンパク質分解システム⁴⁷⁾をもち、菌体表面に存在するプロティナーゼといくつかのペプチダーゼを働かせ、カゼインを細胞に必要なアミノ酸や小さなペプチドにまで分解することは非常に重要な行為である。このことは、チーズなども含めた発酵乳製品のフレーバー生成にも大きく関与している。プロティナーゼの C 末端の 18 アミノ酸の疎水性部分は、菌体表層へ固定するためのアンカー配列で遺伝子組換え技術で構築された C 末端を欠いたプロティナーゼは培地中に分泌される⁴⁷⁾ことから、このプロティナーゼがもつアンカータンパク質は、乳酸菌の菌体表層に固定させる働きのあることがわかる。本タンパク質のシグナルペプチドとアンカータンパク質 (図 4-A) をもつこれをコードしている *prtY* 遺伝子 (約 1.6 kb, 図 4-B) は、*L. helveticus* CP790 の染色体 DNA に存在しており、すでにクローニングされている⁴⁶⁾。このプロティナーゼの様子より、*prtY* 遺伝子のアクティブドメインに *fimH* 遺伝子を組み込めば、乳酸菌において FimH タンパク質を融合タンパク質として産生させ、菌体外へ放出、そして細胞壁に融合タンパク質が固定されると考えられた。

上記融合タンパク質を発現した組換え乳酸菌が作出されれば、図 5 に示したように、病原性細菌と同じ糖鎖を認識し、宿主の細胞表面へ付着することが可能になるシステムが構築できると思われる。病原性細菌が付着する前に、宿主の細胞表面を組換え乳酸菌が覆うことによって、感染防御が可能であると考えられ、このことはプロバイオティクス乳酸菌の付着に関する研究などで「乳酸菌セラピー」という考え方で述べられている⁴⁸⁾。一方、病原性細菌が付着している糖鎖に対して、より親和性の高い乳酸菌が作出されれば、すでに定着している病原性細菌を排除することも考え得る。

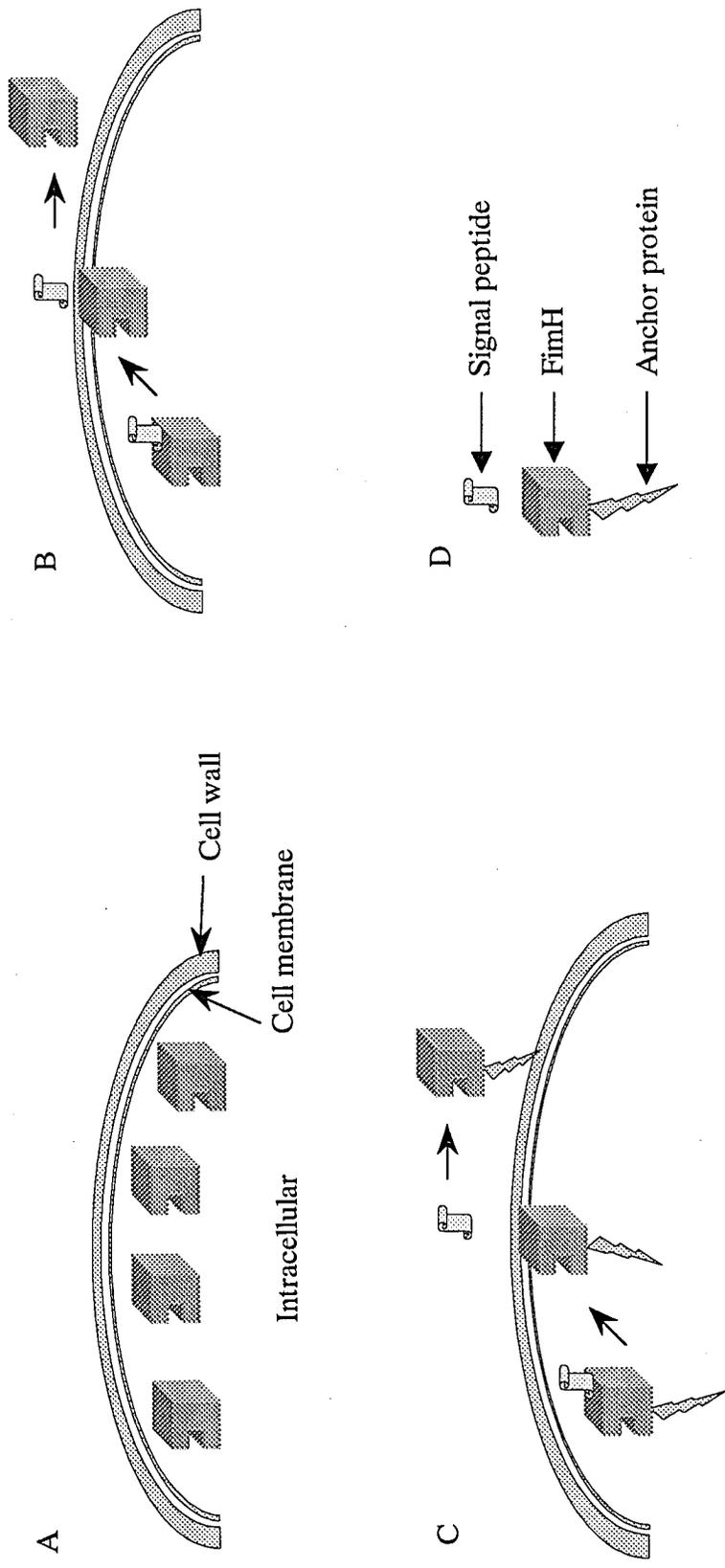


図3. FimHタンパク質を乳酸菌の菌体表層へ固定する方法 (モデル図)

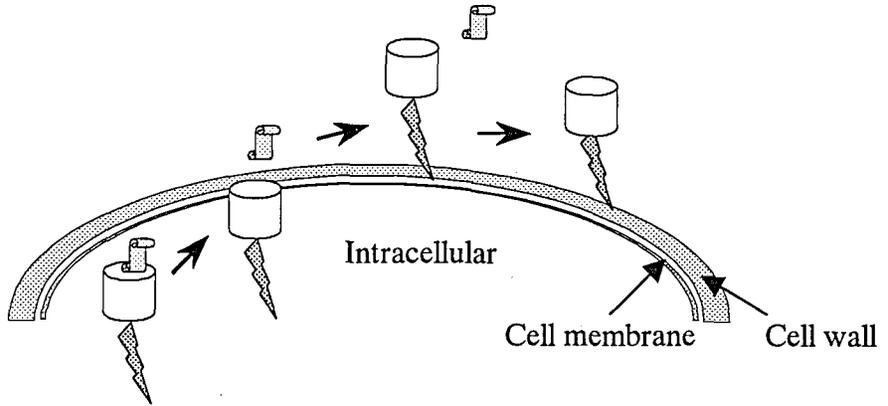
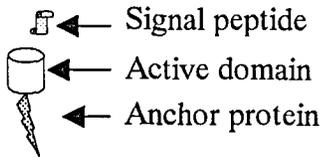
A: FimHタンパク質の発現

B: 菌体外への分泌

C: アンカータンパク質を用いた菌体表層への固定

D: 融合タンパク質

A



B

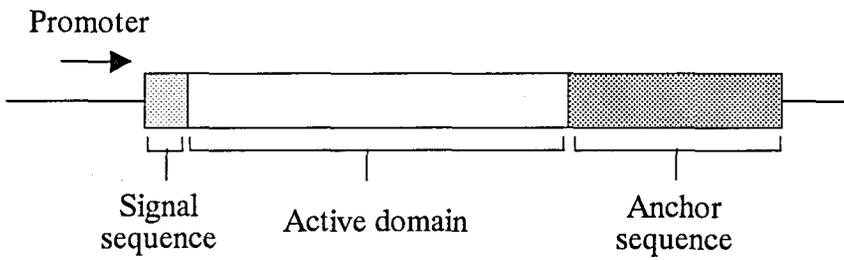


図 4. *L. helveticus* CP790 のプロテイナーゼ⁴⁶⁾

A; 産生されるプロテイナーゼのモデル図

B; プロテイナーゼ (*prtY*) 遺伝子の模式図

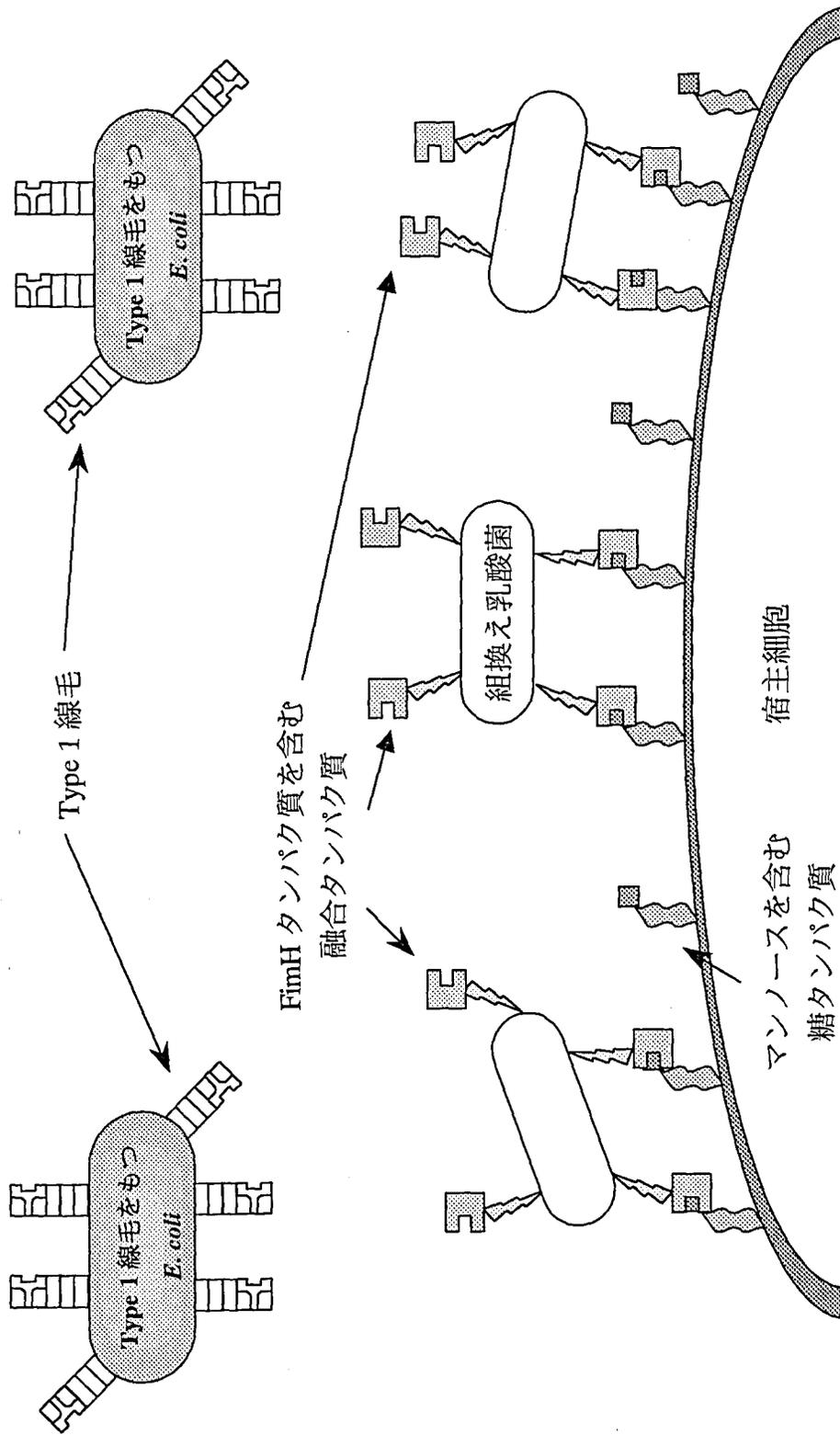


図5. 組換え乳酸菌による競合阻害モデル図

本論文では、第1章において、乳酸菌でタンパク質を発現させるために、まずグラム陽性菌・陰性菌のシャトルベクターに、乳酸菌の *prtY* 遺伝子のプロモーター、シグナル配列、アンカー配列を組み込んだプラスミドを構築し、次に *prtY* 遺伝子のドメインに *E. coli* 由来の線毛アドヒジユンタンパク質遺伝子である *fimH* 遺伝子を組み込んだ。構築したプラスミドについて、DNA シーケンスを行ないその配列を確認した。第2章では、ウェスタンブロッティング法により融合タンパク質の産生を確認した。今回の実験で着目した Type 1 線毛をもつ *E. coli* は、尿路感染症の原因菌^{14, 15)}であるが、感染経路として、腸管を経過してきたものが、尿路感染を起こしている可能性が高い。このことから腸管通過と付着をふまえ、乳酸菌や他の細菌の付着試験^{29-31, 38, 41, 44)}によく使用されるヒト上皮細胞モデルとして結腸線癌由来 Caco-2 細胞への付着競合阻害試験を行なった。第3章において、融合タンパク質遺伝子を発現するプラスミドを用いて乳酸菌 (*Lactobacillus casei* CP680) を形質転換した。乳酸菌菌体内での融合タンパク質の検出は第2章と同様にウェスタンブロッティング法によって確認した。

略語の説明

本研究で供試した菌種と本文中での略表記について以下に示す。

- *Escherichia coli* *E. coli*
- *Lactobacillus helveticus* *L. helveticus*
- *Lactobacillus casei* *L. casei*

菌種名を上記のように略称して表示した。

本研究で供試した菌株の諸性質を表 6 に，プラスミドの諸性質を表 7 に示した。

表 6. 供試菌株の諸性質

| 供試菌株 | 含有プラスミド | サイズ (kb) | 表現型*) | 供試培地 | 入手 (分与) 先 | 参考文献 |
|----------------------------|---------|----------|-----------|------|---------------------|--------|
| グラム陰性菌 | | | | | | |
| <i>E. coli</i> JM105 | - | - | - | LB | アマシャム フアルマシア | 49, 50 |
| <i>E. coli</i> ORN103 | - | - | - | LB | Abraham and Ikeda | 51 |
| <i>E. coli</i> EPI | pEPI | 7.2 | Ap 耐性 | LB | Yamamoto and Takano | 46 |
| <i>E. coli</i> JM105 | pY01 | 7.4 | Tc, Ap 耐性 | LB | 本研究 | |
| <i>E. coli</i> ORN103 | pSH2 | 15.2 | Cm 耐性 | LB | Abraham and Ikeda | 53 |
| <i>E. coli</i> JM105 | pY790 | 6.6 | Tc, Ap 耐性 | LB | 本研究 | |
| <i>E. coli</i> JM105 | pYEFH01 | 6.4 | Tc, Ap 耐性 | LB | 本研究 | |
| グラム陽性菌 | | | | | | |
| <i>L. helveticus</i> CP790 | - | - | - | MRS | Yamamoto and Takano | 46 |
| <i>L. casei</i> CP680 | - | - | - | MRS | Yamamoto and Takano | 52 |
| <i>L. casei</i> CP680 | pYEFH01 | 6.4 | Tc 耐性 | MRS | 本研究 | |

*) 薬剤略語 Ap: アンピシリン, Cm: クロラムフェニコール, Tc: テトラサイクリン.

表7. 供試プラスミドの諸性質

| 供試プラスミド | プラスミドサイズ (kb) | 表現型*) | 表現可能な細菌 | 入手(分与)先 | 参考文献 |
|-----------|------------------|--------------|---------------------------------------|---------------------|-------|
| pEPI | 7.2 | Ap 耐性 | <i>E. coli</i> | Yamamoto and Takano | 46 |
| pHY300PLK | 4.9 | Tc, Ap 耐性**) | <i>E. coli, Bacillus subtilis***)</i> | Takara | 54-58 |
| pY01 | 7.4 | Tc, Ap 耐性 | <i>E. coli, Bacillus subtilis</i> | 本研究 | |
| pSH2 | 15.2 | Cm 耐性 | <i>E. coli</i> | Abraham and Ikeda | 53 |
| pY790 | 6.6 | Tc, Ap 耐性 | <i>E. coli, Bacillus subtilis</i> | 本研究 | |
| pYEFH01 | 6.4 | Tc, Ap 耐性 | <i>E. coli, Bacillus subtilis</i> | 本研究 | |

*) 薬剤略語は、表6と同様。

**) pHY300PLKは、宿主菌株がグラム陽性菌のとき、Tc耐性能をもち、グラム陰性菌のときTc, Ap耐性。

***) 特定の乳酸菌 (*L. casei* など) においても複製。

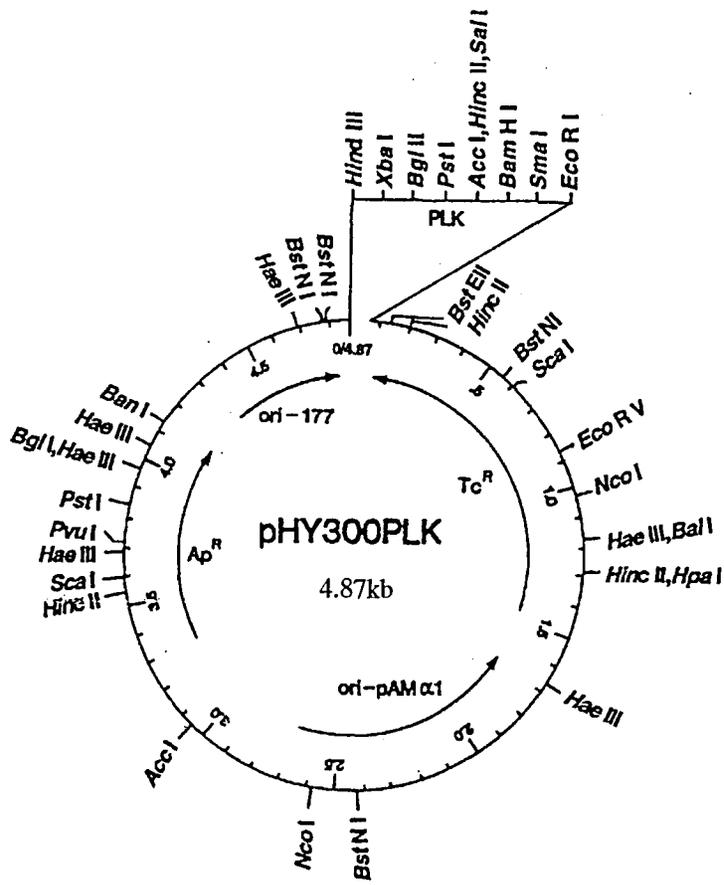


図 6. pPHY300PLK の制限酵素地図

第1章

E. coli 由来線毛アドヒジュンタンパク質遺伝子を
発現させる乳酸菌遺伝子への組み込み

目 的

乳酸菌は一般に、動物やヒト腸管内に定着し、腸内細菌叢の改善に貢献し、その菌体成分や発酵生産物の生理効果、ならびに生きている乳酸菌が発揮する生理効果についても、さまざまな角度から研究されている。このような生理効果を顕著に示すプロバイオティクス乳酸菌の腸管における定着性は重要視されている。乳酸菌の付着については、1980年代後半より現在に至るまで種々報告されており²⁴⁻⁴⁵⁾、付着性は動物やヒトなど宿主の細胞表面に存在する糖鎖を認識する菌体表層タンパク質によるものとされているが、その付着因子や付着強度についての統一的な見解はほとんどみられない。また乳酸菌の付着因子として、病原性細菌と同じ糖鎖をレセプターとしている場合も考えられるが、異なるレセプターである場合には、広い腸管をイメージすると病原性細菌の付着を効率的に競合阻害するとは考えがたい。

本研究では、宿主への付着機能がよく知られている Type 1 線毛をもつ *E. coli* の線毛遺伝子に注目した (図 1)¹⁵⁾。この Type 1 線毛遺伝子は約 9.0 kb の大きさを形成しており、線毛の各タンパク質の発現のために、プロモーターをいくつか有している。Type 1 線毛のアドヒジュンタンパク質である FimH タンパク質は線毛の先端に存在し、その FimH タンパク質をコードしている *fimH* 遺伝子 (約 0.9 kb) は線毛遺伝子の下流に存在する。DNA シークエンスの解析より *fimH* 遺伝子はプロモーターをもたないが、シグナル配列を有していることがわかっている¹⁵⁾。FimH タンパク質は、宿主の細胞表面のマンノースをレセプターとして付着する。乳酸菌の菌体内で FimH タンパク質を産生させ、菌体外に放出、菌体表層に固定することによって、乳酸菌に哺乳動物 (宿主) の消化管などの上皮細胞

表面への付着する機能を付与することが考えられる。また、FimH タンパク質と同じ機能をもつ乳酸菌によって、Type 1 線毛をもつ *E. coli* が付着する前に、宿主の細胞表面に存在する同じマンノースに乳酸菌が付着し、競合阻害して感染防御すると推測した。この FimH タンパク質を乳酸菌の菌体内で産生させるための発現プラスミドを構築することとした。

しかし、グラム陰性菌の *fimH* 遺伝子を乳酸菌で発現させるためには、その上流に乳酸菌用のプロモーターが必要である。また、乳酸菌の菌体内で産生された FimH タンパク質を菌体外へ放出するためのシグナル配列と、放出されたタンパク質を菌体表層に固定させるアンカー配列が存在することで、乳酸菌の菌体表層に FimH タンパク質を固定し機能を発揮することが可能となる。本研究では *L. helveticus* CP790 のプロティナーゼ (*prtY*) 遺伝子⁴⁶⁾ (図 4) を用いた。*prtY* 遺伝子は、菌体内で産生されたプロティナーゼを菌体外へ放出するシグナルペプチドと菌体表層に固定するアンカータンパク質をコードしている。この *prtY* 遺伝子のシグナル配列とアンカー配列の間のドメイン部分に *fimH* 遺伝子を組み込み、融合タンパク質として産生させ、乳酸菌の菌体表層への融合タンパク質を固定させるプラスミドの構築に応用した。

乳酸菌の形質転換において、宿主・ベクター系の確立は菌種・菌株ごとに条件が異なることが知られている⁶⁰⁾。*E. coli* は、遺伝子の発現系はよく研究され、目的のタンパク質の獲得に最も多く用いられる宿主である。すなわち、*E. coli* は分子生物学的解析が長年にわたって行われてきた結果、さまざまな目的に応じた宿主となる菌株とベクター系が確立されており、その多くは市販されるなど入手しやすいこと、また増殖が速く、形質転換やプラスミドの抽出などが容易であること、実験室で用いられる菌株の安全性が認められている⁶¹⁾。以上のことから、本実験で構築したプラスミド

の解析を容易に進めるために、グラム陽性菌とのシャトルベクターを用い、*E. coli* を宿主としてまず供試した。すなわち、*E. coli* で容易に構築プラスミドを複製させ、また最終的には乳酸菌でのタンパク質の産生とその機能を確認するために、グラム陽性菌・陰性菌のどちらでも複製可能なシャトルベクターである pHY300PLK (図 6) を用いた。また、乳酸菌用のプロモーターとして、*priY* 遺伝子⁴⁶⁾ (約 1.6 kb) を用いた。*priY* 遺伝子のプロモーター部分から遺伝子全体を確実に使用するために、すでにクローニングされている pEPI⁴⁶⁾ のプロモーターの上流を DNA シークエンスにより確認した。シークエンスしたプロモーターの上流から *priY* 遺伝子が PCR 増幅するように、また pHY300PLK に組み込めるように制限酵素認識配列を含むプライマーを設計した。テンプレート DNA として *L. helveticus* CP790 の染色体 DNA を抽出し、設計したプライマーより *priY* 遺伝子の PCR 増幅を行なった。また、*fimH* 遺伝子の PCR 増幅するためのテンプレートとしては、クローン化された *E. coli* 由来の線毛遺伝子 pSH2⁵³⁾ を用いた。PCR 増幅された *fimH* 遺伝子を、*priY* 遺伝子のドメインの部分に組み込み、FimH タンパク質を含む融合タンパク質を産生させるプラスミドの構築を試みた。

実 験 材 料

<供試菌株とプラスミド>

供試菌株とプラスミドは、以下のものを供試した（表 6, 7）。

- *E. coli* JM105
- *E. coli* EPI
- *E. coli* ORN103 (pSH2)
- *L. helveticus* CP790
- pHY300PLK

<供試培地>

供試培地は、以下のものを供試した。

- LB 液体培地

| | |
|---------|-------|
| トリプトン | 1.0 g |
| 酵母エキス | 0.5 g |
| 塩化ナトリウム | 1.0 g |

上記成分を蒸留水 100ml で溶解後、121°C, 15 分間高圧滅菌した。

- MRS 液体培地

| | |
|-------------------|-------|
| MRS Broth (Oxoid) | 5.2 g |
|-------------------|-------|

蒸留水 100 ml で溶解し、121°C, 15 分間高圧滅菌した。

- アンピシリン (Ap) 溶液 (5 mg/ml)

| | |
|--------|-------|
| アンピシリン | 0.5 g |
|--------|-------|

蒸留水 100 ml で溶解後、滅菌フィルター（孔径 0.2 μ m）でろ過し、アルミホイルで遮光し、冷蔵保存した（約 1 ヶ月使用可）。

- ・ テトラサイクリン (Tc) 溶液 (2 mg/ml)

テトラサイクリン 0.2 g

蒸留水 100 ml で溶解後，滅菌フィルター（孔径 0.2 μ m）でろ過し，アルミホイルで遮光し，冷蔵庫で保存した（約 2~3 週間使用可）。

- ・ Ap および Tc 含有 LB (LBTc) 寒天培地

LB 液体培地に 1.5%の細菌用粉末寒天を添加し，121 $^{\circ}$ C，15 分間高圧滅菌した。約 50 $^{\circ}$ Cまで冷却後，上記の Ap 溶液および Tc 溶液を 1%添加して静かに混合し，シャーレに流し入れ暗所（約 30 $^{\circ}$ C）で一晩乾燥させた。

<制限酵素> （すべて Takara の製品を用いた）

用いた制限酵素は，*Bam*H I，*Eco*R I，*Xba* I，*Spe* I および *Bpu*1102 I でその詳細は，表 8 に示した。

<供試試薬>

- 1) Alkaline Lysis Miniprep 法⁵⁷⁾によるプラスミド抽出用試薬

- ・ 0.1 M トリス塩酸 (Tris-HCl, pH 8.0)

トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) 1.21 g

蒸留水で溶解し，HCl を pH 8.0 になるまで添加し，100ml にメスアップした。調製後，121 $^{\circ}$ Cで 15 分間高圧滅菌した。

- ・ 0.25 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液 (pH 8.0)

EDTA 7.3 g

蒸留水で溶解し，pH 8.0 に調整した後，100 ml にメスアップした。

- ・ グルコース/トリス/EDTA (GTE) 溶液

グルコース 0.9 g

表 8. 本実験に供試した制限酵素⁵⁹⁾

| 制限酵素 | 認識する 塩基配列 | 添付バッファー (10×) | 反応温度 |
|-------------------|--------------------------------|------------------------------|------|
| <i>Bam</i> H I | G G A T C C C C T A G G | K | 30°C |
| <i>Eco</i> R I | G A A T T C C T T A A G | H | 37°C |
| <i>Xba</i> I | T C T A G A A G A T C T | M | 37°C |
| <i>Spe</i> I | A C T A G T T G A T C A | M | 37°C |
| <i>Bpu</i> 1102 I | G C T N A G C C G A N T C G | <i>Bpu</i> 1102 I 専用バッファー | 37°C |

0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 25.0 ml

0.25M EDTA 溶液 (pH 8.0) 4.0 ml

上記成分を蒸留水で溶解後 100 ml にメスアップし, 121°Cで 15 分間
高圧滅菌した。

・ 水酸化ナトリウム・硫酸ドデシルナトリウム (NaOH/SDS) 溶液

水酸化ナトリウム 8.0 g

硫酸ドデシルナトリウム (SDS) 1.0 g

上記成分をそれぞれ蒸留水で溶解後 100 ml にメスアップし, 121°C
で 15 分間高圧滅菌した。実験で使用する際, 等量ずつ混合して用い
た。

・ 5M 酢酸カリウム (pH 4.8)

氷酢酸 29.5 ml

水酸化カリウムを pH 4.8 になるまで添加し, 蒸留水で 100ml にメス
アップし, 高圧滅菌せずに, 常温保存した。

・ 酢酸カリウム溶液

5 M 酢酸カリウム溶液 60.0 ml

酢酸 11.5 ml

蒸留水 28.5 ml

上記の割合で, 実験を行なう際に混合した。

・ フェノール・クロロホルム

フェノール 500 g

下記の 3%塩化ナトリウム溶液により溶解した。この時, フェノ
ールの瓶には思ったより少量しか入らないが, 蓋を密栓しユニバ
ーサルシェイカーで振盪すると完全に溶解した。

| | |
|--|--------|
| 3%塩化ナトリウム溶液 塩化ナトリウム 蒸留水で溶解し，400 ml にメスアップした。 | 12.0 g |
|--|--------|

上記の溶解したフェノールと等量のクロロホルムを混合し，褐色瓶に移し，フェノールの酸化を防止するために，3%塩化ナトリウム溶液を入れ，蓋にパラフィルムを巻いて密栓し冷蔵保存した。

- ・ 0.1M Tris-HCl (pH 7.5)

前述の 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) と同様に，Tris を蒸留水で溶解し，HCl を pH 7.5 になるまで添加し，100ml にメスアップした。調製後，121°C で 15 分間高圧滅菌した。

- ・ リボヌクレアーゼ A (RNase A) 溶液 (1mg/ml)

RNase A 0.1g

0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) を 10 mM になるように蒸留水で 100 ml に調製し RNase A を溶解した。その後，マイクロチューブに 1ml ずつ分注し，95°C の高温槽で 10 分間保持した後，-20°C で保存した。

- ・ ジエチルエーテル (常温のものを使用した)

- ・ 5 M 塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム 29.22 g

蒸留水で溶解し 100 ml にメスアップした後，121°C で 15 分間高圧滅菌した。

- ・ 99%エタノール (-20°Cで冷凍保存した。)

- ・ 70%エタノール (-20°Cで冷凍保存した。)

2) アガロースゲル電気泳動用試薬

- ・ TBE バッファー (5×TBE バッファーを作り，使用するとき 5 倍希釈した。)

| | |
|------------------------|---------|
| Tris | 5.39 g |
| ホウ酸 | 2.75 g |
| 0.25M EDTA 溶液 (pH 8.0) | 4.00 ml |

蒸留水で溶解し，室温で保存した。

- ・ エチジウムブロマイド (EtBr) 溶液 (10 mg/ml)

| | |
|------------|-------|
| エチジウムブロマイド | 0.1 g |
|------------|-------|

蒸留水 10 ml で溶解し，遮光して冷蔵保存した。

*DNA サンプルを電気泳動した後のアガロースゲルの染色に用いた。

- ・ アガロースゲル電気泳動用 DNA サンプルバッファー

10×loading バッファー (Takara)

制限酵素などに添付されているものを使用した。

- ・ 分子量マーカー

λ-*Hind* III digest (Takara)

3) クローニング用試薬

- ・ ライゲーションバッファー

DNA Ligation Kit Ver. 2 I液 (Takara)

- ・ 塩化カルシウム溶液

| | |
|---------|--------|
| 塩化カルシウム | 0.55 g |
|---------|--------|

| | |
|-------------------------|----------|
| 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) | 10.00 ml |
|-------------------------|----------|

上記成分を溶解し 100 ml にメスアップ後，121°Cで 15 分間高圧滅菌した。

4) プラスミド抽出試薬

- ・ プラスミド抽出用カラムキット (Quantum prep[®] plasmid mini prep kit, BIO-RAD)

細胞懸濁溶液 (Cell resuspension solution)

細胞溶解溶液 (Cell lysis solution)

中和溶液 (Neutralization solution)

マトリックス (Quantum prep matrix)

洗浄溶液 (Wash buffer) *99%エタノールを等量加えて, 調製した。

• TE バッファー

Tris 0.12 g

0.25 M EDTA 溶液 (pH 8.0) 40.0 ml

上記成分を溶解後, pH 7.5 に調整して 100 ml にメスアップし, 121°C
で 15 分間高圧滅菌した。

5) シークエンス用試薬

• プライマー (合成オリゴプライマー, 日本製粉)

pHY4849F : 5'-CCTATGGAAAAACGCTTTGC-3' (20mer, Tm=54°C)

pHY74R : 5'-AGAGTTCAAAATTGATCCTT-3' (20mer, Tm=48°C)

• シークエンス反应用試薬

200 μ l の GeneAmp チューブに以下のように反応液を調製した。

Terminator Ready Reaction Mix 0.008 ml

Template DNA 0.3 μ g

プライマー : pHY4849F または pHY74R 3.2 pmol

計 0.02 ml になるように純水を添加した。

• 10×TBE バッファー

Tris 108.0 g

ホウ酸 55.0 g

0.5M EDTA (pH 8.0) 40.0 ml

上記成分を蒸留水で 1,000ml にメスアップした。

- ・ シークエンス用ゲル溶液

以下の試薬をビーカーに用意し、40~45°Cに加熱しながらスターラーで攪拌した。

| | |
|--------------|---------|
| 尿素 | 25.00 g |
| アクリルアミド | 2.85 g |
| ビスアクリルアミド | 0.15 g |
| 10×TBE バッファー | 5.0 ml |

完全に溶解させた後、蒸留水で 50ml にメスアップし、0.2 μ m フィルターでろ過した。

- ・ 3M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.6)

| | |
|---------|---------|
| 酢酸ナトリウム | 24.61 g |
|---------|---------|

蒸留水で溶解し、pH 4.6 になるまで氷酢酸を添加し、100ml にメスアップした。

- ・ 10%ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS)

| | |
|-----|--------|
| APS | 0.1 g |
| 蒸留水 | 1.0 ml |

蒸留水で溶解後、マイクロチューブで-20°Cで保存した。

- ・ N, N, N', N',-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)

| | |
|-------|-------|
| TEMED | 30 ml |
|-------|-------|

- ・ シークエンス用ローディングバッファー

| | |
|-------------------------|-------------|
| 脱イオンホルムアミド | 100 μ l |
| 0.05 M EDTA 溶液 (pH 8.0) | 20 μ l |

6) 染色体 DNA 抽出試薬

- ・ 酵母・グラム陽性菌用ゲノム抽出キット (GenTLE くん™, Takara)

Gen TLE™ Yeast Solution I

Gen TLE™ Yeast Solution II

Gen TLE™ Yeast Solution III

- ・ イソプロパノール（市販のものを常温で使用した。）

7) PCR 用試薬

- ・ Taq ポリメラーゼ

Z-Taq™ (Takara)

- ・ プライマー（下線部：制限酵素サイト，合成オリゴプライマー，日本製粉）

prtYF 5'-CGTCTAGAACGGGGGTTGATTGATCGGG-3'

(28mer, Tm=66°C)

prtYR 5'-GCGGATCCCTCGCTTTCCCTTTATTTAG-3'

(28mer, Tm=63°C)

fimHF 5'-TGCCTGGTCATTCACTAGTAAAACCGCCAA-3'

(30mer, Tm=66°C)

fimHR 5'-TCGCTGGAATAAGCTTAGCGTTGCGCGTCA-3'

(30mer, Tm=66°C)

実験方法

1. プロティナーゼ遺伝子のプロモーター上流のシーケンス

プロティナーゼ (*prtY*) 遺伝子上流をシーケンスするために、すでにクローニングされている pEPI⁴⁶⁾ より、*prtY* 遺伝子を pHY300PLK に組み換えた。

1) Alkaline lysis miniprep 法⁶²⁾ によるプラスミドの抽出

《供試菌株の調製》

LB 液体培地 10 ml に Tc 溶液 (2 mg/ml) を 1% 添加した *E. coli* HB101 (pEPI) を接種し、37°C で一晩培養した培養液を 1.5 ml 用いた。培養液をマイクロチューブで卓上遠心機で 12,000 r.p.m. で 5 分間遠心分離し、上清を取り除き、菌体をペレット化したものをサンプルとして用いた。

《プラスミド抽出》

菌体ペレットを、GTE 溶液 0.1 ml で懸濁し、溶解後 5 分間室温に置いた。次に、NaOH/SDS 溶液 0.2 ml を添加し、指ではじいて混合後、5 分間氷上に置いた。酢酸カリウム溶液 0.15 ml を添加し、ボルテックスミキサーで混合後、5 分間氷上に置いた。12,000 r.p.m. で 5 分間遠心して、上清を新しいマイクロチューブに移した。

得られた上清に RNase A 溶液を 1 μ l 添加した後、等量のフェノール・クロロホルムを添加後、遠心分離して上清を新しいマイクロチューブに移した。この上清に、パスツールピペットでジエチルエーテルを約 1 ml 添加し、蓋をしてよく混合した。この作業により、プラスミド溶液中のわずかなフェノール・クロロホルムの除去を行なった。ジエチルエーテル (上清) と DNA 溶液が分離したら、上清をパスツ

ルピベットによって除去した。わずかに残った層は、空気を送るとジエチルエーテルは気化し、除去することができた。また、気化を助けるためにマイクロチューブの蓋を開けたまま、1分間程度放置した。

《エタノール沈殿》

この上清に 5N 塩化ナトリウム溶液を最終的に 1N になるように (90 μ l) 添加し、2.5 倍量の 99%エタノールを添加後、-20°Cで 5~10 分間静置した。12,000 r.p.m.で 5 分間遠心分離し、抽出したプラスミドを沈殿させた。70%エタノールを添加し、12,000 r.p.m., 5 分間遠心分離し、沈殿したプラスミドのペレットを真空ポンプを用いて乾燥させた。

得られたプラスミドを TE バッファーに溶解し、アガロースゲル電気泳動によってプラスミドを確認した。

2) アガロースゲル電気泳動法

《アガロースゲルの作成》

三角フラスコに入れた 1×TBE バッファーに、1.0% SEAKEM ME AGAROSE (FMC) を加え、マイクロウェーブを用いて、500Wで約 2 分 30 秒間ゲルが完全に溶解するまで加熱した。約 45°Cまで冷却した後、ゲルメーカーセット (Mupid[®]-2, コスモ・バイオ) に流し込み、コームを差し込み固まらせた。約 15 分間以上静置し固まってからコームを抜き取り、ゲルプレートミニゲル泳動槽に入れ、1×TBE バッファーをゲルが十分に浸るように入れた。

《プラスミドのアガロースゲル電気泳動》

TE バッファーに溶解したプラスミドに 10×loading バッファーを 10 倍希釈になるよう添加し、軽くベッティングした後、ゲルのウェルにアプライし、パワーサプライをセットし 100V で約 30 分間泳動した。同時に分子量マーカー (λ -Hind III digest, Takara) を泳動した。

泳動後、プラスチックタッパーに入れた蒸留水 300ml に EtBr 溶液を 0.1% 添加し、アガロースゲルを入れ約 3~5 分間浸漬した後、蒸留水が入った別のプラスチックタッパーで洗浄した。約 10 分間浸漬すると、過剰にゲルに入ったエチジウムブロマイドが蒸留水に流れ出て、泳動した DNA サンプルをより鮮明に確認することができた。

洗浄したアガロースゲルをラップを敷いた紫外線テーブル (TRANS ILLUMINATOR, フナコシ) 上に置き、フェイスマスクを装着し紫外線を照射して、プラスミドを確認した。

《ポラロイドカメラによるゲルの撮影》

ポラロイドカメラ (MP-4 電気泳動ゲル撮影セット, (株) 藤本写真工業) のピントを合わせ、レンズに紫外線と青色線を遮断するフィルター (赤色 R1 フィルター) を着け、フィルムをセットしシャッターを押し、約 13 秒間シャッターを開けた (絞り: F8)。フィルムを抜き取り、約 30 秒後にポラロイド写真が完成した。

3) クローニング法

《制限酵素処理 (*Bam*H I, *Eco*R I による消化)》

TE バッファー 8 μ l に溶解した pEPI および pHY300PLK を、それぞれマイクロチューブに入れ、制限酵素 *Bam*H I と 10 \times K バッファーを最終溶液量の約 1/10 量 (1 μ l) ずつ入れて 30 $^{\circ}$ C で 2 時間消化した。2 倍量のフェノール・クロロホルムを添加し、12,000 r.p.m. で 5 分間遠心分離して上清を新しいマイクロチューブに移し、エタノール沈殿を行なった。

再び、TE バッファー 8 μ l に溶解し、*Eco*R I と 10 \times M バッファーを溶液の 1/10 量 (1 μ l) ずつ入れて 37 $^{\circ}$ C で 2 時間消化した。消化後、これに TE バッファーで溶解し、アガロースゲル電気泳動を行なった。

《アガロースゲルからのプラスミドの抽出》

電気泳動したアガロースゲルについて、紫外線テーブルで目的の DNA 断片を確認し、できるだけ余分なゲルを入れないようにエタノール消毒したカッターの刃で切り出した。切り出したゲル片をゲル抽出用フィルター付カップ (SUPREC™-01, Takara) に入れ、12,000 r.p.m., 10 分間、4°C で遠心した。その後、フィルター付カップに TE バッファー 200 μ l 入れ、再度 12,000 r.p.m. で 10 分間、4°C で遠心した。遠心によって得られた遺伝子溶液をエタノール沈殿し真空ポンプで乾燥させた。

《ライゲーション》

アガロースゲルから切り出す際に濃度を確認し、TE バッファーに溶解した pHY300PLK と *prtY* 遺伝子を、濃度比が pHY300PLK : *prtY* 遺伝子=1 : 10 の割合で混合し、DNA 溶液と同量のライゲーションバッファー (DNA Ligation Kit Ver. 2, Takara) の I 液を添加した。よく混合した後、16°C で 2 時間～一晩静置した。

4) ヒートショックによる *E. coli* の形質転換法

《受容菌の調製》

E. coli JM105 を LB 培地に 1 コロニーを白金耳で接種し、37°C で一晩培養した (プレ培養)。プレ培養した *E. coli* JM105 を、三角フラスコ入りの LB 培地 100 ml に 1% 接種し、37°C で 2~4 時間、振とう培養した ($OD_{550}=0.2\sim0.5$)。培養液を氷中で 10 分間冷却し、4°C で 4,000 r.p.m., 5 分間遠心し菌体を回収する。上清を除き、ペレットを氷中で冷却した塩化カルシウム溶液 1 ml に懸濁した。氷上に 15 分間静置した後、4°C で 4,000 r.p.m., 5 分間遠心した。上清を除き、ペレットの量に応じて、最終的に 0.2 ml ずつ分注する量で塩化カルシウム溶液に懸濁し、マイクロチューブに分注した。

《ヒートショック》

0.2 ml ずつ分注した受容菌に、ライゲーションした DNA 溶液 5 μ l を添加後、混合して 30 分間水中に静置した。氷冷したサンプルチューブを恒温槽で 42°C で 2 分間加熱した後、水中に 5 分間静置した。その後、1 ml の LB 培地を添加後、37°C で 1 時間、振とう培養した。培養したものを、1/10 量ずつ Tc 含有 LB 選択培地に塗抹し、37°C で一晩培養し Tc 耐性形質転換体を得た。

5) カラムによるプラスミド抽出法

《供試菌株の調製》

上記で得られた Tc 耐性形質転換体を LB 液体培地 10 ml に Tc 溶液を 1% 添加したものに接種し、37°C で一晩培養した培養液を 1.5 ml 用いた。培養液をマイクロチューブで卓上遠心機で 12,000 r.p.m. で 5 分間遠心分離し、上清を除去し菌体をペレット化したものをサンプルとして用いた。

シーケンス用のプラスミド抽出は、プラスミド抽出用カラムキット (Quantum prep[®] plasmid mini prep kit, BIO-RAD) を用いて、操作は添付の手順に従って行なった。精製したプラスミドは、TE バッファーに溶解し、アガロースゲル電気泳動により精製度と濃度を確認した。

6) DNA シーケンス

濃度を確認したプラスミドサンプルを用いて、PERKIN ELMER Dye Terminator Cycle Sequencing に基づいて、反応、精製およびシーケンスを行なった。

《シーケンス反応》

反応液の入った GeneAmp チューブを、あらかじめ 96°C にしておいた iCycler (BIO-RAD) にセットし、1 サイクル : 96°C で 2 分、50°C で 15 秒、60°C で 4 分を計 25 サイクルで反応させ、反応終了後は 4°C で保

存した。1.5 ml のマイクロチューブに 2 μ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH 4.6) と 50 μ l の 99%エタノールを混合した。反応終了後の反応液全量をこのマイクロチューブに添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した後、氷中に 10 分間静置した。その後、12,000 r.p.m.で 30 分間遠心後、上清をピペットでできる限り取り除いた。そこに、250 μ l の 70%エタノールを添加し、12,000 r.p.m.で 15 分間遠心分離した。上清を除き真空ポンプでペレットを乾燥させた。

《シークエンス用ゲルの作製》

オートシークエンサー用のガラスを専用の洗剤を用いて両面とも洗浄し蒸留水でリンスした。風乾した後、ガラスの両面とも内側になる面をさらに 99%エタノールで JK ワイパーを用いて 2 回磨いた後、ガラス板を組み立てた。ゲル溶液を 10 分間脱気した後、250 μ l の 10%APS と、30 μ l の TEMED を添加しよく混合後、50 ml のシリンジを用いて組み立てたガラス板に注入した。ガラス板を水平に置き、ゲルキャスティングコームを差し込み、2~3 時間放置して、十分にゲルを重合させた。

《シークエンシング》

重合したゲル板を洗浄した後、オートシークエンサー (PERKIN ELMER 373A DNA Sequencing System) に設置し、バッファー槽に 1× TBE バッファーを満たして 10 分間プレランを行なった。シークエンス反応で精製したサンプルを、5 μ l のシークエンス用ローディングバッファーに溶解し、90°Cで 2 分間加熱した後、氷で急冷した。ゲルのプレランを中止してサンプルをゲルにロードし泳動を開始し、電気泳動は 14 時間行なった。

2. シャトルベクターを用いた *prtY* 遺伝子のサブクローニング

7) 染色体 DNA 抽出法

L. helveticus CP790 を一晩培養したものを 1.5 ml (~ 1.2 OD₆₀₀) よりペレット化し、酵母・グラム陽性菌用ゲノム抽出キット (Takara) を用いて、染色体 DNA を抽出した。操作は、キットの手順に従って行なった。抽出し 100 μ l の TE バッファーに溶解した染色体 DNA 溶液をエタノール沈殿させたあと、真空ポンプにて染色体 DNA ペレットを乾燥させた。乾燥した染色体 DNA を TE バッファーに溶解し、アガロースゲル電気泳動で確認した。

8) PCR 法

《PCR 反応》

濃度を確認した染色体 DNA を PCR に供試した。PCR 試薬には、*Z-Taq*TM (Takara) を用いて、PCR 反応液を表 9-A の割合で調製した。操作は氷上で行なうと、プライマーのミスアニーリングが原因の非特異的増幅を抑えることができる。

各試薬を 200 μ l チューブに順番に加えていき、最後にピペッティングにより攪拌した。PCR 反応条件は、表 9-B のように iCycler (BIO-RAD) のプログラムに設定し、反応液を調製後、すぐに反応をスタートした。反応終了後、反応液の約 1/10 量 (5 μ l) を用いて、アガロースゲル電気泳動法で増幅断片を確認した。

9) *prtY* 遺伝子のサブクローニング

手順は、3)の方法に順じて行なった。pHY300PLK および PCR 増幅した *prtY* 遺伝子断片を、制限酵素 *Bam*H I および *Xba* I により消化した。消化された両遺伝子をアガロースゲル電気泳動し、ゲルから抽出した。ゲルから抽出した両遺伝子をライゲーションを行なった。

表9. PCR条件⁵⁸⁾

A. 反応液の調製*)

| 反応液 | Vol. (μ l) |
|-------------------------------------|-----------------|
| Mili Q | 37.5 |
| 10 \times Z-Taq buffer | 5.0 |
| dNTP mix | 4.0 |
| Template DNA (0.3 μ g/ μ l) | 1.0 |
| Forward Primer (0.5 μ M) | 1.0 |
| Reverse Primer (0.5 μ M) | 1.0 |
| Z-Taq | 0.5 |
| 計 | 50.0 |

B. PCR条件

| PCR cycle program | Steps | Temp. | Times |
|-------------------|-----------|-------|----------|
| Cycle 1 (1回) | | 98°C | 4 min. |
| Cycle 2 (30回) | Step 1 | 98°C | 5 sec. |
| | Step 2**) | 55°C | 10 sec. |
| | Step 3 | 72°C | 20 sec. |
| Cycle 3 (1回) | | 72°C | 3 min. |
| Cycle 4 (1回) | | 4°C | ∞ |

*) 反応液は、表の上から順番に200 μ lチューブに添加した。

***) 反応温度は、プライマーのT_m値に合わせた。

ライゲーション反応させたサンプルを用いて、4)のヒートショックを行ない、Tc 耐性形質転換体を得た。得られた Tc 耐性形質転換体のプラスミド抽出を 1)の方法で行ない、プラスミドをアガロースゲル電気泳動し確認した (pY790 の構築)。

3. pY790 への *fimH* 遺伝子の組み込み

10) *fimH* 遺伝子のクローニング

アガロースゲル電気泳動により確認された pY790 の *prtY* 遺伝子領域に *fimH* 遺伝子を組み込んだ。

《pSH2 をテンプレートにした *fimH* 遺伝子の PCR 増幅》

E. coli ORN103 (pSH2) を、プラスミド抽出用カラムキットを用いて抽出し、操作は添付の操作手順に従って行なった。精製した pSH2 は、アガロースゲル電気泳動によって濃度を確認し、これをテンプレートとして、プライマー (*fimHF* および *fimHR*) を用いて前述の PCR 法で行なった。PCR 産物は、DNA 回収用フィルター付遠心チューブ SUPREC™-02 (Takara) を用いて精製した。精製した PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動で確認した。

その後のクローニング手順は、3)の方法に順じて行なった。*fimH* 遺伝子の PCR 産物と pY790 を、制限酵素 *Spe* I および *Bpu*1102 I により消化した。消化された両遺伝子をアガロースゲル電気泳動し、ゲルから抽出後、ゲルから抽出した両遺伝子をライゲーションした。ライゲーション反応したサンプルを用いて、4)のヒートショックを行ない、Tc 耐性形質転換体を得た。得られた Tc 耐性形質転換体のプラスミド抽出を 1)の方法で行ない、アガロースゲル電気泳動しプラスミドを確認した (pYEFH01 の構築)。

結果および考察

プラスミド pYEFH01 の構築

本研究において用いたベクターは、クローニングの操作を考慮し、グラム陰性菌・陽性菌のどちらでも複製できるシャトルベクター pHY300PLK を用いた。

今回、*fimH* 遺伝子を乳酸菌の菌体内で発現させるために、*prtY* 遺伝子の完全なプロモーター領域を用いる必要がある。しかし、プロモーター領域より上流の配列は DDBJ [No. AB026985] に登録されておらず、本研究で DNA シーケンスにより遺伝子配列を決定することとした。すでにクローン化された *prtY* 遺伝子、pEPI を用いたが、このプラスミドは、pKK223-3 (4.6 kb, アマシャム ファルマシア) のマルチクローニングサイトに存在する *Bam*H I, *Eco*R I に組み込まれている。本研究で用いる pHY300PLK にも両制限酵素サイトが存在するため、*prtY* 遺伝子をこの制限酵素により pKK223-3 から切り出し、pHY300PLK に組み込み、ヒートショックにより *E. coli* JM105 の形質転換を行なった。得られた Tc 耐性形質転換体のプラスミドをプラスミド抽出用カラムキット (Quantum prep[®] plasmid mini prep kit, BIO-RAD) を用いて抽出した。このプラスミドを pHY300PLK のプライマー (pHY4849F, pHY74R) を用いて、シーケンスした結果、プロモーター領域より上流 400 bp が決定された (図 7)。

この結果に基づいて、*prtY* 遺伝子のプロモーター領域の上流および終止コドンの下流に、5'末端に制限酵素の認識配列を含むアダプター配列を付加し、プライマーを設計した。プライマー *prtYF* および *prtYR* (図 7) には、アダプター配列として、*Bam*H I と *Xba* I を組み込んだプライマーに設計することで、PCR 増幅された増幅断片はこの 2 つのサイトをもつ遺伝子断片

となり、同制限酵素により消化したベクタープラスミドに組み込むことができる。*priY* 遺伝子を増幅させるために、*L. helveticus* CP790 の染色体 DNA をゲノム抽出キットを用いて染色体 DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。

PriY 遺伝子の PCR 増幅断片および pHY300PLK を *Bam*H I と *Xba* I で消化 (図 8) し、アガロースゲルから目的の断片を切り出して精製した。精製した両者を混合しライゲーションを行なった。その後、ライゲーションさせたプラスミドを用いて、ヒートショックによる *E. coli* JM105 の形質転換を行なった。Tc 含有 LB 寒天培地によるスクリーニングを行なった結果、Tc 耐性形質転換体を得られたので、これらからプラスミドを抽出し、アガロースゲル電気泳動したところ、プラスミド pY790 が確認できた (図 9)。

次に、pY790 に *fimH* 遺伝子をクローニングするために、*fimH* 遺伝子配列を含むプラスミド pSH2 をテンプレートに、プライマー *fim*HF および *fim*HR により PCR 増幅を行なった。こちらも *priY* と同様に、アダプター配列として *Spe* I と *Bpu*1102 I サイトをプライマーに設計し、PCR を行なった。増幅された *fimH* 遺伝子断片および pY790 を *Spe* I と *Bpu*1102 I を用いて消化 (図 10) し、ライゲーション後、再度ヒートショックによる *E. coli* JM105 の形質転換を行なった。得られた Tc^r 形質転換体について、プラスミドを抽出したところ、プラスミド pYEFH01 が確認できた (図 11)。抽出したプラスミドを電気泳動したところ、制限酵素によってクローニングサイトに増幅断片が入っているのは確認できたが、*priY* 遺伝子領域に *fimH* 遺伝子断片が確実に組み込まれているのを確認するには、シーケンスして遺伝子配列を見る必要がある。そこで構築されたプラスミドについて、シーケンスを行なった。

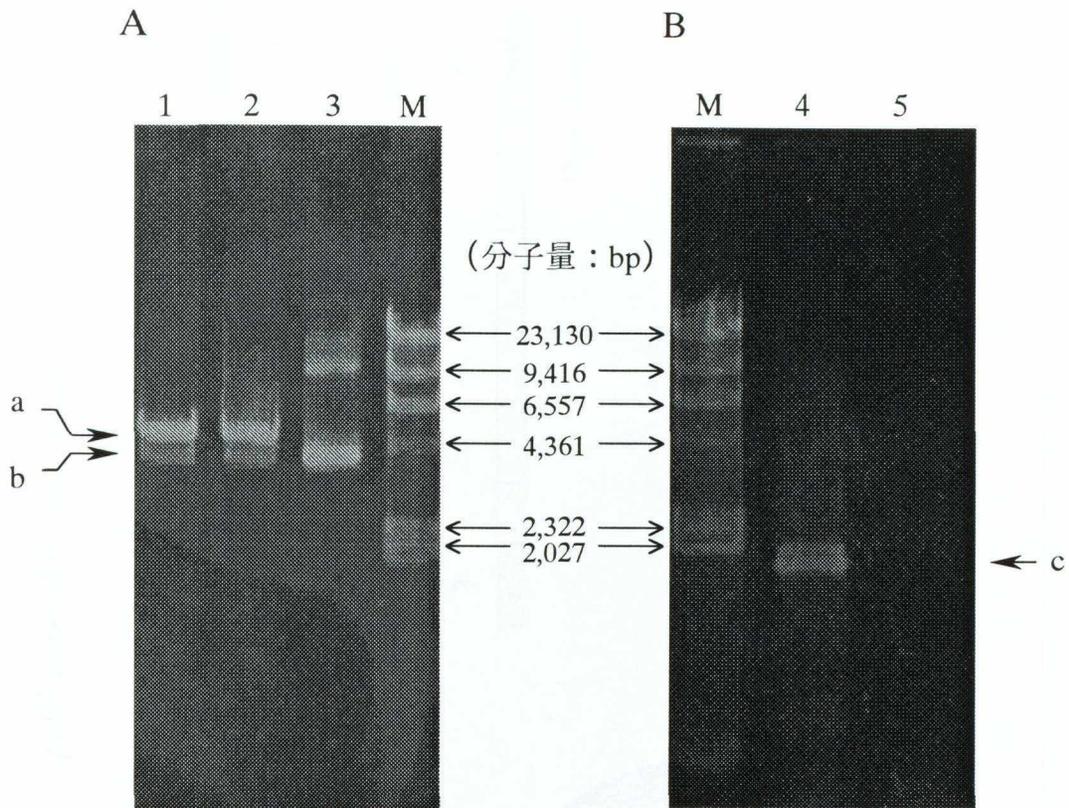


図 8. pY790 の構築に用いた pHY300PLK および *prtY* 遺伝子

A. pHY300PLK

レーン 1, 2: *Bam*H I, *Xba* I で消化した pHY300PLK (矢印 a: 4,870bp)

レーン 3 : 未消化の pHY300PLK (矢印 b)

B. PCR 増幅した *prtY* 遺伝子

レーン 4 : PCR 増幅した *prtY* 遺伝子断片 (矢印 c : 約 1,700bp)

レーン 5 : negative control

フォワードプライマー : *prtYF*

リバースプライマー : *prtYR*

レーン M : λ -*Hind* III digest 分子量マーカー

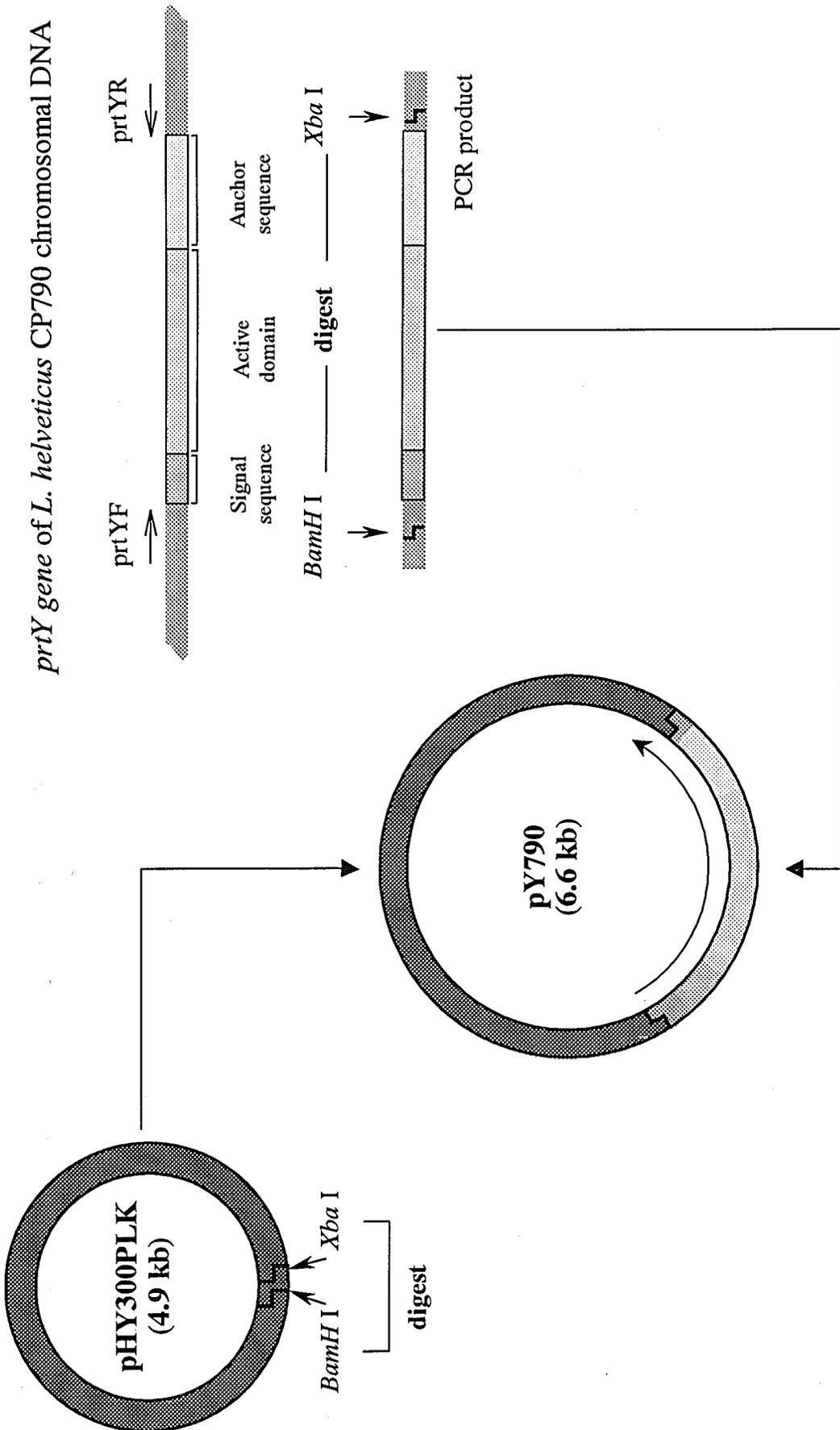


図9. *PHY300PLK* への *prtY* 遺伝子のサブクローニング
 シャトルベクターの *BamH*I, *Xba*I サイトへの *prtY* 遺伝子増幅断片の組み込み

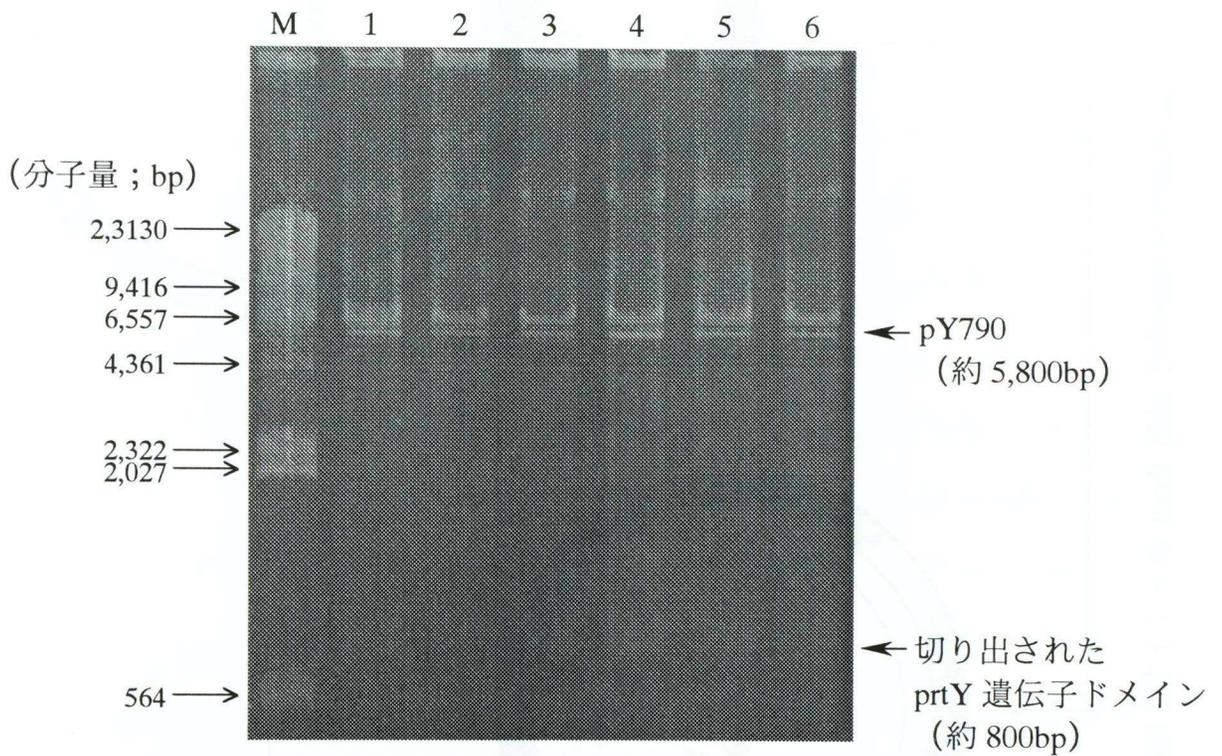


図 10. *Spe* I および *Bpu*1102 I で消化した pY790

レーン M : λ -*Hind* III digest 分子量マーカー

レーン 1~6 : *Spe* I および *Bpu*1102 I で消化した pY790

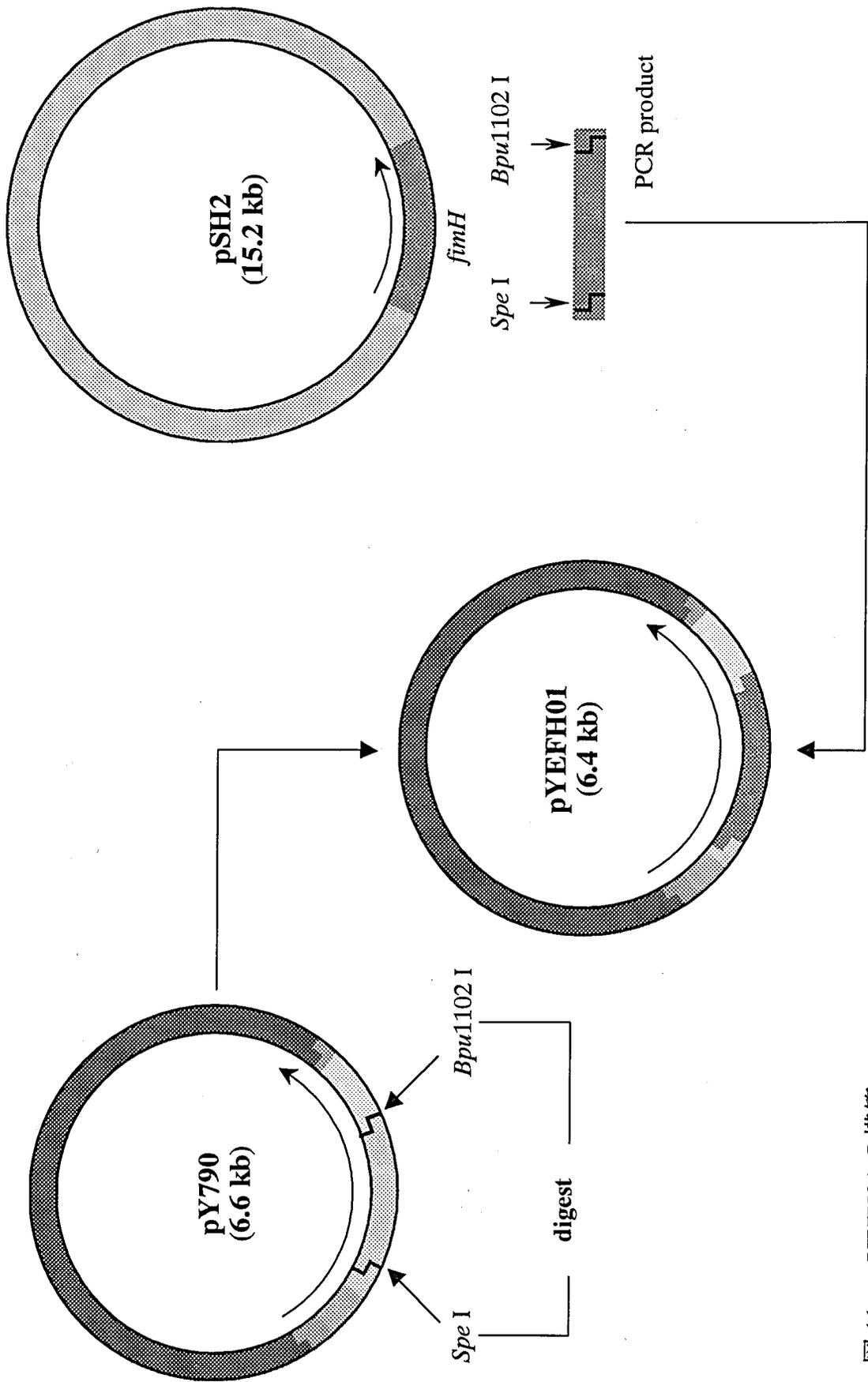


図 11. pYEFH01 の構築
pY790 の *prtY* 遺伝子に存在する *Spe I*, *Bpu1102 I* サイトへの *fimH* 遺伝子増幅断片の組み込み

構築したプラスミドのシーケンス

pYEFH01のシーケンスは前述のプライマーpHY4849FとpHY74Rを用いて行なった。図12のように配列が決定され、*prtY* 遺伝子のドメイン部分に *fimH* 遺伝子断片が組み込まれているのが確認できた。

本実験で、pHY300PLKのマルチクローニングサイトに *prtY* 遺伝子を組み込むために、*Bam*HIと*Xba*I切断サイトをアダプター配列としてプライマーに設計し、PCRを行なった。増幅されたPCR断片には、プライマーに含まれるアダプター配列が増幅断片に付加される。今回の実験において *fimH* 遺伝子断片の組み込む際も、制限酵素サイトを組み込む必要があり同様の考え方を用いた⁶³⁾。PCRのプライマーは、5'末端側にミスマッチがあっても機能する場合が多い。このプライマーで得られたPCRフラグメントは両端に制限酵素認識部位があるので、その制限酵素で切断することによって5'-リン酸基をもつ突出末端が両端に作られ、遺伝子断片は容易にベクターに組み込むことができる。プライマーを設計する際の注意点としては、認識配列の外側にさらに数塩基余分にヌクレオチドを追加した方が制限酵素による切断が確実であることと、認識配列を含むアダプター部分はプライマーのアニーリングに寄与しないので、 T_m の推定値はアダプター部分を覗いた遺伝子特異的領域のみのオリゴヌクレオチドとして計算する点が考えられる。また、2つのプライマーに異なる制限酵素部位を付加しておくことで、PCR増幅断片の方向を決めてベクターに組み込むことができる。本実験で、*prtY* 遺伝子のドメイン部分へ *fimH* 遺伝子断片を組み込む際に、その方向性とアミノ酸のコドンを考慮して複製するようライゲーションし、シーケンスによって遺伝子配列を確認した。

fimH 遺伝子のシーケンス結果から、シグナル配列を入れない領域でプライマーを設計した。これは *E. coli* 由来のシグナル配列が入っていても乳酸菌の菌体内で産生させるので、FimHタンパク質由来のシグナルペプチドは機能しな

ATGAAGAAAAATTTAAGAAITGTTAGCGCTGCTGCTGCTTTATTAGCTGTTGCTCCTGTTGCTGCAACTGCTATGCCAGTTAACGGTGTACTACTGTTACTACTTCAACTACTACT 120
 M K K N L R I V S A A A A L L A V A P V A A T A M P V N A A T T V T T S T T T 40
Signal sequence
 AACAAAGCCAACTGTTGACTTAAGTGGTGCAGGTTCTGTTAGTGAATCTAAGATACTGTTAATGTAACCTCCATCTTTGACTAGTAAACCGGCAATGGTACCGCAATCCCTATT 240
 N K P T V D L S G A G S V S E S K D T V N V T P S F T L T S K T A N G T A I P I 80
Spe I →fimH
 GGGGTGGACGGCCCAATGTTATGTAAACCTGCGGCTGCGGTGAATGTGGGCAAAAGCTGGTCTGATCTTTCCACGCAAAATCTTTGGCATAAGGATTAACCCAGAAAGCATTACA 360
 G G S A N V Y V N L A P A V N V G Q K L V V D L S T Q I F C H N D Y P E T I T 120
 GACTATGTCACACTGCAACGAGGTTGGCTTATGGGCGGTTATCTAGTTTTCGGGACCGTAAAATAATAATGGCAGTAGCTATCCTTCCCTACTACCAGGCAACGGCCGGGTT 480
 D Y V T L Q R G S A Y G G V L S S F S G T V K Y N G S S Y P F P T T S E T P R V 160
 GTTATAATTCGAGAACCGATAAGCCGTGGCCGGTGGCCCTTATTTGACGCCGGTGAGCAGTGGGGGAGTGGCGATTAAGCTGGCTGATTAATGGCCGTGCTATTGGCGACAG 600
 V Y N S R T D K P W P V A L Y L T P V S S A G G V A I K A G S L I A V L I L R Q 200
 ACCAACTATAACAGCGATGATTCACAGTTGTTGGAAATTTACGCCAAATAATGATGTGGTGGTGGCCACGGGCTGGGATGTTCTGCTGGTATGTCACCGTTACTCTGCCG 720
 T N N Y N S D D F Q F V W N I Y A N N D V V V P T G G C D V S A R D V T V T L P 240
 GACTACCTGTTGAGTGGGATTCCTGTTACCGTTATTGTTGGAAAGCCAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGGACACCCGAGATGGGGCAACTCGATTTCACCAATACCGGG 840
 D Y P G S V P I P L T V Y C A K S Q N L G Y Y L S G T T A D A G N S I F T N T A 280
 TCGTTTCACCCCGCAGGGCGTGGCGTACAGTTGACCGCAAGGCTAAGCGTGTGGTACTGACAAGGTAACCTCGTTACAACCGTGTAACTGTTGCTATGAACACTACTAAGCTTGCT 960
 S F S P A Q G V G V Q L T R N A K R V G T D K V T R Y N A V T V A M N T T K L A 320
Bpu1102 I Anchor sequence
 AACGGTATTTACTACAGCATCGAAAAACGGCAAGCAACTGGCAAGTACATCAACCGTGACAACATCGATGGTACTAAGCGTACTTTGAAGCACCAAGCCATACGTTTACGAGTCATCA 1080
 N G I S Y Y S I E N G K A T G K Y I N A D N I D G T K R T L K H N A Y V Y E S S 360
 AAGAAGCGTCAACAAGGTTGTTCTTAAGAAGGGTACTGAAGTAACTACTACGGTAAATCCATACACCTTCAAGAAGCCGCAAGAGTACTACAAGATCGGGTGTGACACCAAGAAGACT 1200
 K K R A N K V V L K K G T E V T T Y G N P Y T F K N G K K Y Y K I G A D T K K T 400
 TACGTTAGAGTTGAAAAACTTTGACTAA 1227
 Y V R V E N F D * 409

図 12. 構築したプラスミドのシーケンス
fimH 遺伝子領域：影がついている領域

いと考え、この領域をはずして PCR 増幅するようにした。また *prtY* 遺伝子はシグナル配列とアンカー配列をもつので、この遺伝子配列を利用することで、Type 1 線毛のアドヒジュンタンパク質をコードした *fimH* 遺伝子を乳酸菌において発現させ、PrtY タンパク質が産生されるように、シグナルペプチド-FimH タンパク質-アンカータンパク質という融合タンパク質 (図 3) が産生されると推測できる。この融合タンパク質は、乳酸菌の菌体内で産生されて、菌体表面層に固定されると考えられる。しかし、*E. coli* が宿主であるためシグナルペプチドが機能せず、*E. coli* の菌体内に融合タンパク質が蓄積していると推定し、菌体破碎液を用いて融合タンパク質の機能性を分析することとした。

第 2 章において、この産生された融合タンパク質をウェスタンブロッティング法により検出し、その機能性をヒト腸管上皮モデル培養細胞を用いた線毛による付着性をもつ *E. coli* との付着阻害試験を行なった。

要 約

第1章では、*E. coli* と乳酸菌の両者において融合タンパク質を産生するようにプラスミドの構築を行なった。はじめに *prtY* 遺伝子のプロモーター上流のシーケンスを決定し、完全にプロモーターを含むよう制限酵素 *BamH* I および *Xba* I サイト (配列中の下線部) を組み込んだプライマー (*prtYF*; 5'-CGTCTAGAACGGGGGTTGATTGATCGGG-3', *prtYR*; 5'-GCGGATCCCTCGCTTTCCCTTTATTAG-3') を設計した。PCR 増幅した *prtY* 遺伝子を、pHY300PLK の *BamH* I と *Xba* I サイトに組み込み、pY790 を構築した。

次に pY790 にサブクローニングした *prtY* 遺伝子内の *Spe* I と *Bpu*1102 I で切断されるドメイン (約 800 bp) を除去した後、両制限酵素サイトを含むプライマー (*fimHF*; 5'-TGCCTGGTCATTCACTAGTAAAACCGCCAA-3', *fimHR*; 5'-TCGCTGGAATAAGCTTAGCGTTGCGCGTCA-3') で PCR 増幅した約 680 bp の *fimH* 遺伝子を組み込み、pYEFH01 を構築した。この pYEFH01 をシーケンスしたところ、*prtY* 遺伝子のドメインにフレームが合うように *fimH* 遺伝子が組み込まれているのを確認した。このプラスミドは *E. coli* と乳酸菌で *fimH* 遺伝子を発現し、FimH タンパク質と PrtY タンパク質を含む融合タンパク質を産生するものと推測され、次章以下でその証明を行なった。

第2章

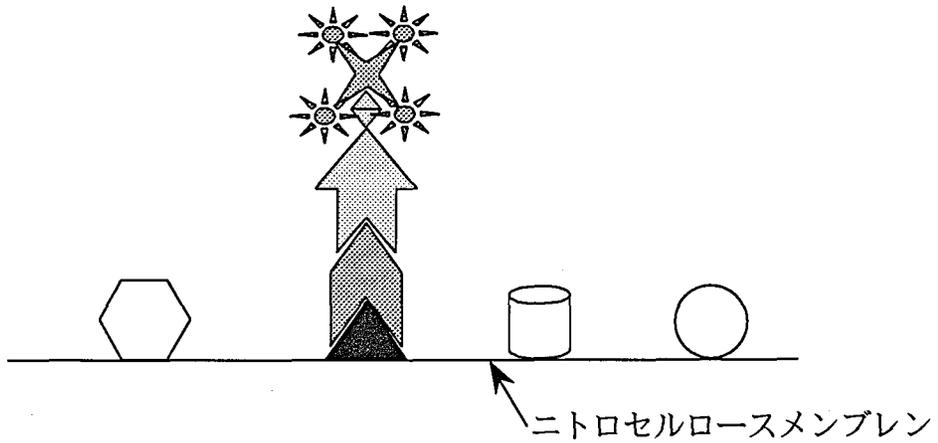
アドヒジュンタンパク質を含む 融合タンパク質の機能解析

目 的

第1章では、*E. coli* 由来の *fimH* 遺伝子および *L. helveticus* CP790 由来の *prtY* 遺伝子の両遺伝子を組み込んだ pHY300PLK を用いたプラスミド pYEFH01 を構築した。このプラスミドに組み込まれた遺伝子配列は、DNA シークエンスによって確認したが、*E. coli* および乳酸菌においてこの遺伝子が発現し、産生された融合タンパク質が、FimH タンパク質の機能を有するかどうかを確認する必要がある。

産生された融合タンパク質を検出するために、ウェスタンブロッティング法を用いた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により分子量ごとに分離された各タンパク質をニトロセルロースメンブレンへ転写し、検出目的のタンパク質の抗体を用いて、特異的なバンドとして検出する方法である。

pYEFH01 に組み込まれたシグナル配列は、乳酸菌の細胞膜を通過するシグナルペプチドとして産生されるため、今回受容菌として用いた *E. coli* JM105 では融合タンパク質が産生されても、菌体外への分泌はされないと推測される。そのため本実験では、*E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体細胞を破碎し菌体タンパク質 (検体) として用いた。本菌の菌体内で融合タンパク質が産生されていれば、抗体と反応させた時に抗原となるタンパク質すなわち目的のタンパク質が検出できる。この時の一次抗体には、*E. coli* ORN103 (pSH2) から分離・精製された FimH タンパク質⁶⁴⁾ (Ikeda, T. and S. N. Abraham より分譲) を抗原として、抗 FimH マウス血清 (ポリクローナル抗体) を作製 (本研究) し、プロテイナーゼを抗原として得た抗 PrtY マウス血清⁴⁶⁾ (モノクローナル抗体, Yamamoto, N. *et al.* より分譲) を用いた (図 13)。それぞれの抗体に反応したものは、それぞれの抗体が認識するタンパク質を含む融合タンパク質であると証明できる。二次抗体には、図 13 のように市販のビオチン標識抗マウスヤギ IgG



- ▲ 抗原タンパク質 (融合タンパク質)
- ✦ アビジン
- 一次抗体 (抗 FimH マウス血清) (抗 PrtY マウス血清)
- ☀ ペルオキシダーゼと発色剤

- ← ビオチン
- 二次抗体 (ビオチン標識抗マウスヤギ IgG)

⬡ ⬢ ⬣ 抗原以外のタンパク質

図 13. 免疫染色法モデル⁶⁵⁾

を用いた。

次に、*E. coli* JM105 (pYEFH01) で産生された融合タンパク質の機能性を確かめた。病原性細菌や乳酸菌の付着試験では宿主モデル細胞に結腸腺癌由来 Caco-2 細胞がよく用いられている^{29-31, 38, 41, 44, 66)}のでこの Caco-2 細胞を使用した方法⁶⁶⁾をもとに、本実験では各供試菌株の付着試験および付着阻害試験を行なった。FimH タンパク質の性質をもつ融合タンパク質が産生されていれば、Type 1 線毛と同じくマンノースを認識して、融合タンパク質による付着競合阻害ができると考えられる。

まず、Type 1 線毛遺伝子をノックアウトした付着性がない *E. coli* ORN103⁵¹⁾ および Type 1 線毛をもつ *E. coli* ORN103 (pSH2)⁵³⁾ の付着強度の違いを検討した。次に、*E. coli* ORN103 (pSH2) が付着した Caco-2 細胞に、融合タンパク質を産生する *E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体タンパク質を加え、融合タンパク質による付着阻害試験を行なった。

実験材料

<供試菌株>

供試菌株は以下のものを使用した。

- *E. coli* JM105 (pYEFH01)
- *E. coli* JM105
- *E. coli* ORN103 (pSH2)
- *E. coli* ORN103

<供試試薬>

供試試薬は以下のものを使用した。

1) SDS-PAGE 試薬

- リン酸バッファー：PBS (pH 7.4)

| | |
|---|-------|
| NaCl | 8.0 g |
| Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O | 2.9 g |
| KCl | 0.2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 g |

上記成分を超純水 1,000 ml で溶解したが、この分量で作成すると pH 7.4 付近になる。溶解後、121°C で 15 分間高圧滅菌した。

- 10% (w/v) 硫酸ドデシルナトリウム (SDS) 溶液

蒸留水で溶解し、室温で保存した。

- 4×分離ゲル用バッファー

| | |
|---------------|---------|
| Tris | 18.17 g |
| 10% (w/v) SDS | 4.00 ml |

HCl を加えて pH 8.8 に調整し、蒸留水で 100 ml にメスアップした。

・ 4×濃縮ゲル用バッファー

Tris 12.11 g

10% (w/v) SDS 8.00 ml

HClを加えて pH 6.8 に調整し、蒸留水で 100 ml にメスアップした。

・ 30%アクリルアミド

アクリルアミド 150.0 g

N,N'-メチレンビスアクリルアミド 4.0 g

蒸留水で 500 ml にメスアップした。

・ 過硫酸アンモニウム (APS)

1.5% (w/v) 過硫酸アンモニウム 15 mg

上記成分を蒸留水 1 ml で溶解し、4°Cで保存した。

・ サンプルバッファー

グリセロール 10.0 ml

β -メルカプトエタノール 5.0 ml

10% (w/v) SDS 30.0 ml

濃縮ゲル用バッファー 12.5 ml

ブロムフェノールブルー (BPB) 1.0 g

蒸留水で 100 ml にメスアップした。

・ 4×泳動バッファー

Tris 12.0 g

グリシン 57.6 g

NaOHを添加し pH 8.3 に調整し、1,000 ml になるように蒸留水でメスアップする。

2) ブロットニング用試薬

- ・ ブロットニング用バッファー

| | |
|-------|----------|
| Tris | 7.6 g |
| グリシン | 36.0 g |
| メタノール | 500.0 ml |

上記成分を pH 8.6 に調整し、蒸留水で 3,000 ml にメスアップした。

3) 免疫染色用試薬

- ・ 一次抗体 ; ①抗 FimH マウス血清

②抗 PrtY マウス血清⁴⁶⁾

(それぞれ, 0.5% カゼイン - PBS で 1,000 倍希釈したもの)

*抗血清の調製は以下の方法で行なった。

- 1) 動物 : BALB/c マウス♀ (日本チャールスリバー), 6 週齢を用いた。
- 2) 免疫サンプル (抗原) : 精製 FimH タンパク質⁶⁴⁾ (200 μ g/ml, PBS に溶解) を用いて, 免疫するアジュバンドを以下のように調製した。

初回免疫アジュバンド

免疫サンプル 10 μ g 合わせてインコンプリートフロイント (Difco) を 10 μ g 用いて作製した。

2回目~5回目免疫アジュバンド

初回と同様に免疫サンプルと合わせてコンプリートフロイント (Difco) を用いて作製した。

*抗原は約 10 μ g/回/匹を, 1 週間毎に皮下注射した。

- 3) 採血 : 5 回目の免疫終了後, 4 日目に全採血
- 4) 抗血清 : 採血したものを室温に 1 時間放置後, 15,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離後上清を回収し, 抗血清として -20°C に保存した。

- ・ 二次抗体 ; ビオチン標識抗マウスヤギ IgG (カッペル)
(0.5% カゼイン - PBS で 1,000 倍希釈したもの)
- ・ 酵素 ; アビジン-ペルオキシダーゼ (カッペル)
(0.5% カゼイン - PBS で 2,000 倍希釈したもの)
- ・ 発色液
クロロナフトール 3mg/ml を含むメタノールと PBS を容量 1:5 の割合で混合し、H₂O₂ を一滴垂らしたものをを用いた。
- ・ ブロッキング用試薬
0.5% カゼイン - PBS
カゼイン 2.5g を PBS 500 ml に溶解して使用した。

4) 細胞培養用試薬

- ・ 仔牛血清 (Gibco BRL)
55°C, 30 分間加熱し、不活性化させ、後述の MEM 培地に 5% 添加した。
- ・ MEM 液体培地 (Gibco BRL)
超純水を用いて溶解し、1N NaOH または 1N HCl により pH 7.2~7.4 に調製した。その後、滅菌済みのメディウム瓶に 0.2 μ m の滅菌フィルターでろ過滅菌した。通常は冷蔵保存し、培養細胞の培地交換をする際に 37°C に加熱して用いた。
- ・ 0.1% SDS - 0.2N NaOH

| | |
|------|-------|
| NaOH | 8.0 g |
| SDS | 0.1 g |

上記成分を蒸留水で溶解し、100 ml にメスアップした。

実験方法

1. ウェスタンブロットティング法

1) SDS-PAGE

産生された融合タンパク質を Laemmli⁶⁷⁾の方法に基づいて SDS-PAGE で分離した。

《アクリルアミドゲルの作成》

分離ゲル (12%)

| | |
|---------------------|---------|
| 30%アクリルアミド | 4.00 ml |
| 分離ゲル用バッファー (pH 8.8) | 2.50 ml |
| APS | 0.03 ml |
| TEMED | 0.03 ml |

TEMED 以外の成分と蒸留水を 10 ml になるように 15 ml プラスチックチューブに入れ、混合した。ゲル作成用ガラスサンドイッチ板 (ミニプロテイン II 1-D セル, BIO-RAD) を組み立てて置き、最後に TEMED を加えて静かに混合し、ゲル板の間に流し入れた。その後、ゲルの上部にエタノールを重層し、約 1 時間重合させた。ゲルが重合したのを確認し、蒸留水でエタノールを洗い流した。ゲルの上に残った蒸留水は、ろ紙などで除去した。

濃縮ゲル (10%)

| | |
|---------------------|---------|
| 30%アクリルアミド | 1.00 ml |
| 濃縮ゲル用バッファー (pH 6.8) | 1.00 ml |
| APS | 0.02 ml |
| TEMED | 0.02 ml |

分離ゲルと同様に、TEMED 以外の成分と、5 ml になるように蒸留水を

入れて混合した。TEMED を添加後、固まった分離ゲルの上にすばやく重層し、スクエアティース用コームを差し込んで、重合するまで静置した。ゲルが固まったら、流水をかけながらコームを抜き取った。

《サンプルの調製》

E. coli JM105 (pYEFH01) および *E. coli* JM105 を 37°C で一晩振とう培養後、培養液 1 ml をマイクロチューブに入れ、4,000 r.p.m. で 10 分間遠心後、菌体ペレットを得た。菌体を PBS 1 ml に懸濁し、ソニケーター 5203 (Ohtake works) を用いて、100W で 10 秒間超音波破碎した。破碎した菌液を遠心し、上清を菌体タンパク質サンプルとした。これにサンプルバッファを加え、90°C で 10 分間加熱処理した。

《SDS-PAGE による電気泳動》

クランプアッセンブリーをセットしたインナークーリングコアをバッファ層にセットし、泳動バッファを入れた。ウェルにサンプルを 20 μ l 供試した。泳動は電気泳動用パワーサプライ ; パワーパック 300 (BIO-RAD) を使用し、条件は電流を 40 mA に設定し、約 1 時間泳動した。

2) ニトロセルロースメンブレンへのブロッティング

SDS-PAGE によって分離した菌体タンパク質を抗体による免疫染色に供するために、アクリルアミドゲル中の菌体タンパク質を、トランスブロットセル (BIO-RAD) を用いてニトロセルロースメンブレン (ミリポア) へ転写した。

《ブロッティング》

電気泳動済みのゲルを、ゲルホルダーにセットしたろ紙の上に置き、ゲルの大きさに切っておいたニトロセルロースメンブレンをゲルの上ののせる。その上にろ紙を置き、ゲルホルダーの反対側の板を合わせて、ゲル

ホルダーを閉じる。ゲルホルダーをブロッキングバッファーが入ったタンクに移し、気泡を取り除く。タンクの蓋を閉めて、パワーパック 200 (BIO-RAD) をセットし、電流は 300 mA で 1 時間通電し、ブロッキングを行なった。

3) 免疫染色

ニトロセルロースメンブレンに転写した各タンパク質を検出するのに、抗体を用いる免疫染色を行なった。

《ブロッキング》

各タンパク質を転写したニトロセルロースメンブレンは、抗体の非特異的吸着を防ぐためにブロッキング処理をした。ブロッキングには 0.5% カゼイン-PBS を用いた。プラスチックケースに 0.5% カゼイン-PBS を入れ、この中にニトロセルロースメンブレンを入れて 20 分間ユニバーサルシェイカーなどで振盪した。ブロッキング溶液を捨て、PBS を入れてブロッキング溶液を除いた。

《抗体反応》

図 13⁶⁵⁾ に示したとおり、ブロッキングしたニトロセルロースメンブレンを PBS で洗浄した後、一次抗体を加えて 3 時間振とうした。その後、抗体を含む溶液を捨てて PBS で 10 分間洗浄した。PBS を入れ替えて計 3 回洗浄した。

続いて、二次抗体を加えて 2 時間振とうした。振とう後、PBS で洗浄した。アビジン-ペルオキシダーゼ (カップル) を入れて 1 時間振とうした。PBS により洗浄後、発色液で発色させた。

2. 融合タンパク質によるヒト結腸線癌由来 Caco-2 細胞への *E. coli* の付着阻害試験

4) 試料の調製

《細胞培養》

Caco-2 細胞は、ATCC から入手したものを用いた。不活性化した仔牛血清を 5% 添加した MEM 培地で 5%CO₂ インキュベーターを用いて 37°C で 1 週間培養後、プラスチック 12 ウェル（住友ベークライト）に移し、単層となるまで 1 週間培養し、48 時間毎に培地交換を行なった。培養後、培地を除去し 2% グルタルアルデヒド含有 PBS を添加し、1 時間室温で静置した。その後、PBS で 4 回洗浄した（Caco-2 細胞はウェルから剥がれやすいので注意して洗浄する）。

《供試菌株の調製》

供試菌株の放射性代謝標識には、[methyl ³H]-thymidine (40 Ci/mmol, 室町製薬) を用いた。[methyl ³H]-thymidine (1 μl/ml) を 0.5ml 添加した LB 培地 10 ml に *E. coli* ORN103 (pSH2), *E. coli* ORN103 の菌体を加え、培養した。37°C で 10 時間以上培養した。菌体は培養後、3,000 r.p.m. で 10 分間遠心して回収し、PBS で 2 回洗浄した後、総菌数が 1 × 10⁸ 個/ml となるように PBS に懸濁した。総菌数・生菌数の測定は、標識していない菌体を用いて、それぞれ、トーマ血球計算板を用いて検鏡した。放射性代謝標識した菌体を洗浄し、液体シンチレーションカウンター LSC-900 (アロカ) で放射能を測定した。

《菌体タンパク質》

E. coli JM105 および *E. coli* JM105(pYEFH01) を一晩培養した菌体を 4,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離し、菌体に PBS で 30 秒間ボルテックスミキサーで懸濁し 3,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離し、OD₅₉₀=10 になるように PBS で

懸濁した。ソニケータ-5203 (Ohtake works) を用いて、100W で 10 秒間超音波破碎した。この破碎菌体液を付着阻害試験に供した。

5) 菌体タンパク質による *E. coli* の付着阻害試験

Caco-2 細胞付着阻害活性の測定は、Greene and Klaenhammer⁶⁶⁾ の条件に準じて行なった。

Caco-2 細胞の入ったウェルに放射性代謝標識した *E. coli* ORN103(pSH2), あるいは *E. coli* ORN103 の菌液 0.4ml (1×10^8 個含む) を添加し、37°C で 1 時間培養し、その後 PBS により洗浄した。また *E. coli* JM105 あるいは *E. coli* JM105 (pYEFH01) の破碎菌体液をウェルに同時に添加し、37°C で 1 時間培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄し、ウェルに結合している Caco-2 細胞を 0.1% SDS-0.2 N NaOH 200 μ l を添加し Caco-2 細胞と菌体を回収した。溶解した Caco-2 細胞と菌体をシンチレーション液 (和光純薬) に懸濁して、液体シンチレーションカウンター LSC-900 (アロカ) により放射能を測定した。

結果および考察

ウェスタンブロッティング法による融合タンパク質の検出

Type 1 線毛をもつ *E. coli* は、培養菌体液を菌体表層にマンノースをもつ *Candida albicans* の細胞とプレパラート上で混和させると、凝集反応を起こす。これは、Type 1 線毛がマンノースをレセプターとして付着し、*E. coli* が *Candida albicans* に付着することによって引き起こされる。得られた Tc 耐性形質転換体 *E. coli* JM105 (pYEFH01) について *C. albicans* との凝集反応を試験したところ、凝集はみられなかった。これは、*E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体内において融合タンパク質は産生していたとしても、そのシグナルペプチドは乳酸菌の細胞膜のみを認識するため、融合タンパク質が *E. coli* の菌体外へ放出されなかったのが理由である。このことは、本実験を行なうにあたって推察されたとおりであった。

E. coli JM105 (pYEFH01) の破碎菌体液を、SDS-PAGE によって菌体タンパク質を分子量ごとに分離し、ニトロセルロースメンブランに転写した。このニトロセルロースメンブランに転写された全タンパク質より目的のタンパク質を検出するために、抗 FimH マウス血清を用いた免疫染色を行なった。図 14 のとおり、抗 FimH マウス血清が反応する分子量約 40,000 のバンドが検出された。分子量約 39,800 のところにもバンドが検出されたが、受容菌である *E. coli* JM105 でも同じ分子量のバンドを検出しているため、non-specific なバンドであると認められた。抗 PrtY マウス血清⁴⁶⁾ でも分子量約 40,000 のバンドを検出した。同一の分子量のタンパク質が両抗体で検出されたことより *E. coli* で産生された融合タンパク質には、FimH タンパク質および *L. helveticus* CP790 のプロテイナーゼ由来のアンカーペプチドも含まれることが示めされた。また、プロテイナーゼ由来タンパク質が産生されているということは、乳酸菌由来のシグナ

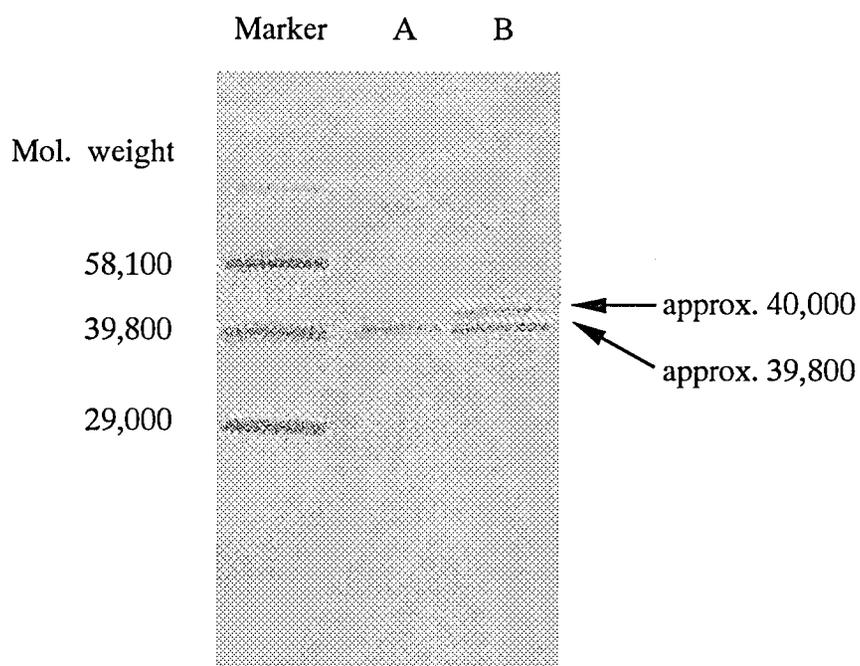


図14. ウェスタンブロッティング法（抗FimHマウス血清）
による目的の融合タンパク質の検出

A : *E. coli* JM105

B : *E. coli* JM105 (pYEFH01)

ルペプチドでは *E. coli* の菌体外に放出はされないことが認められた。それは *E. coli* の菌体内で産生されたプロティナーゼ由来のシグナルペプチドが *E. coli* の細胞膜を認識できないためである。*C. albicans* の凝集試験結果からも明らかのように、*E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体表面に融合タンパク質は存在していないと考えられることから、融合タンパク質は *E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体内において、産生されていることが推測された。

RI 法による Caco-2 培養細胞への *E. coli* ORN103 (pSH2) の付着阻害試験

従来より、Caco-2 細胞への付着試験でよく用いられるのは、グラム染色法によって一視野での付着した菌体細胞数のカウントが主流であったが、培養細胞の立体構造によるばらつきや狭い視野での検鏡による偏りなどで、付着菌数のカウントが明確に反映されない場合がある。そこで本研究では、Greene and Klaenhammer の方法⁶⁶⁾に基づいて、付着させる細菌を放射性代謝標識し、ウェル中で付着したすべての菌数を数値化し付着性を評価する、すなわち RI 法により付着阻害試験を行なった。付着試験に添加した菌数、放射性代謝標識した菌液の放射線量、この放射線量から換算した菌数を表 10 に示した。放射性代謝標識する際に、供試菌株により代謝量にばらつきがあると付着試験後の放射線量に影響するので補正できるように放射線量あたりの菌数を換算した。

E. coli ORN103 (pSH2) および *E. coli* ORN103 を放射性代謝標識し、Caco-2 細胞への付着試験を行なった。付着した菌体細胞数を液体シンチレーションカウンターにより計測したところ、両菌株の付着率に大きな差がみられた。表 10 がその実測値で、表 11 は *E. coli* ORN103 (pSH2) の付着菌数を付着率 100% とし、*E. coli* ORN103 (pSH2) および *E. coli* ORN103 に種々のタンパク質を添加したものについて評価した。その結果、*E. coli* ORN103 の付着率はわずか 9% であった。*E. coli* ORN103 は Type 1 線毛遺伝子をノックアウトした菌株で、線

表 10. 放射性代謝標識時の条件

| 菌 種 | 付着試験に添加した菌数 ($\times 10^8/400 \mu\text{l}$) | 菌液の放射線量 (dpm/400 μl) | 放射線量あたりの菌数 ($\times 10^4/\text{dpm}$) |
|------------------------------|--|-------------------------------------|--|
| <i>E. coli</i> ORN103 | 2.88 | 16992 | 1.69 |
| <i>E. coli</i> ORN103 (pSH2) | 1.60 | 15456 | 1.04 |

表 11. 融合タンパク質による *E. coli* の Caco-2 細胞への付着阻害試験

| Caco-2 細胞へ 付着させた菌株*) | 付着阻害に用いた 菌体タンパク質 | 放射線量 (dpm/ウエル) | 付着菌数/ウエル ($\times 10^6$) | Caco-2細胞への 付着率 (%) | 菌体タンパク質による 付着阻害率 (**) |
|------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| <i>E. coli</i> ORN103 | - | 348.5 | 5.9 | 9 | - |
| <i>E. coli</i> ORN103 (pSH2) | - | 6214.0 | 64.3 | 100 | - |
| <i>E. coli</i> ORN103 (pSH2) | <i>E. coli</i> JM105 | 5772.5 | 59.7 | 93 | 7 |
| <i>E. coli</i> ORN103 (pSH2) | <i>E. coli</i> JM105 (pYEFH01) | 5240.0 | 54.2 | 84 | 16 |

*) 10^8 レベルの菌数を 1 ウエルあたりに添加

***) 付着阻害率 (%) = $100 -$ 付着率 (%)

毛をもたず付着性がないことは文献⁵¹⁾で述べられており、本研究でもそのことが裏付けられ実際付着率の差に反映しているものと考えられた。*E. coli* ORN103 (pSH2) の Type 1 線毛の FimH タンパク質は Caco-2 細胞への付着性において重要な機能をもつことが示された。

次に *E. coli* ORN103 (pSH2) と融合タンパク質を産生する *E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体破砕液を、同時に Caco-2 細胞のウェルに加えたところ、*E. coli* ORN103 (pSH2) の付着率は 84% となり、付着率として 16% 低下した。同様の手順で、*E. coli* JM105 の菌体破砕液を同時に加えたところ、*E. coli* ORN103 (pSH2) の付着率は 7% ほどの低下がみられた。これは、*E. coli* JM105 の菌体タンパク質による Caco-2 細胞への非特異的な付着が *E. coli* ORN103 (pSH2) の付着阻害に多少影響したものと推察される。しかし、*E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体破砕液による *E. coli* ORN103 (pSH2) 付着阻害率の方が高いことから、融合タンパク質は Caco-2 細胞へ付着し、*E. coli* ORN103 (pSH2) の付着を競合阻害したと考えられた。以上のことから、*E. coli* の菌体内で産生された融合タンパク質は、*E. coli* ORN103 (pSH2) と同じマンノースをレセプターとして、Caco-2 細胞へ付着することによって、*E. coli* ORN103 (pSH2) の Caco-2 細胞への付着を阻害したものと示唆された。

本実験で用いた Caco-2 細胞は結腸線癌であり、正常な細胞ではない。Yamashita *et al.*⁶⁸⁾ は、線維芽細胞とウイルスによって癌化した線維芽細胞の表面糖タンパク質糖鎖を解析したところ、細胞が癌化することで、GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man 構造が特異的に増加することを明らかにした⁶⁹⁾。この変化は多くの癌細胞で共通にみられる現象である⁷⁰⁻⁷³⁾。このことから、Caco-2 細胞の表面には特異的に増加したマンノースを含む糖鎖が存在しており、それをレセプターとして FimH タンパク質が付着したものと考えられた。

乳酸菌による腸管内での病原性細菌の付着阻害の報告をあげると次の通り

である。*Lactobacillus acidophilus* の生菌体および死菌体は *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* および *Listeria monocytogenes* の Caco-2 細胞および HT29-MTX 細胞 (ヒト結腸線癌由来) への付着あるいは侵入を阻止することがフランスの研究グループ^{31, 38, 41, 74, 75)} により示されている。また, Hudault *et al.*⁷⁶⁾ は, *Lactobacillus rhamnosus* GG の培養上澄で *Salmonella typhimurium* を前処理することにより, Caco-2 細胞への侵入菌数が減少することを示した。しかし, Lehto *et al.*⁷⁷⁾ は Caco-2 細胞を用いて, *Lactobacillus rhamnosus* GG の *Salmonella typhimurium* に対する付着阻害活性を調べたが, GG 株の培養上澄の添加により付着菌数は減少するが,この原因が培養上清の低 pH により引き起こされた付着性の低下および培養細胞の死滅であることを報告した。このことから, フランスの研究グループの報告^{31, 38, 41, 74, 75)} は, pH による影響であることを強く示唆されているが, 本研究では付着阻害試験に供試した菌体タンパク質は PBS (pH 7.4) で調製しているため pH の影響はないと考えられる。本実験の結果から, 融合タンパク質が Caco-2 細胞へ付着することにより, 付着性を示す *E. coli* の付着を競合阻害したことが示唆された。

この融合タンパク質によって, Type 1 線毛をもつ *E. coli* の細胞付着阻害が認められると考えられると, 感染予防の手段として有効であることが推測できる。さらに, 有用性が高いプロバイオティクスとして乳酸菌でこの融合タンパク質を産生させられれば, Type 1 線毛をもつ *E. coli* の付着競合阻害をするとともに, 宿主である哺乳動物などにとって高い生理効果を示すことが考えられる。プロバイオティクス乳酸菌の付着性向上を目的とし, 乳酸菌での融合タンパク質遺伝子の発現と融合タンパク質の検出については次章で検討した。

第3章

構築プラスミドによる乳酸菌の形質転換と 产生された融合タンパク質の評価

目 的

第2章において、*E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体内で産生された融合タンパク質が、ウェスタンブロッティング法により検出された。本タンパク質は、Type 1線毛をもつ*E. coli* ORN103(pSH2)のヒト結腸腺癌由来Caco-2細胞への付着を阻害することが認められた。これらのことから FimH タンパク質を含む融合タンパク質をコードし発現させるプラスミドが構築でき、このプラスミドは *E. coli* JM105 で複製・発現し、アドヒジエンタンパク質としての機能をもつ融合タンパク質が産生されたことが明らかにされた。

乳酸菌において、この融合タンパク質が産生され、菌体表層に固定されると、Type 1線毛をもつ *E. coli* と同じレセプターを認識し、付着できる組換え乳酸菌として、*E. coli* の宿主の細胞表面への付着を競合阻害することができる。さらにプロバイオティクスとして認められている乳酸菌を受容菌とすれば、宿主の細胞表面への付着強度が向上したことで、宿主の腸内細菌叢の改善や免疫賦活化などの有用性が期待できる。

FimH タンパク質と同じ機能性をもつ融合タンパク質を乳酸菌で産生させるために、すでに構築したプラスミド pYEFH01 による乳酸菌の形質転換を行なった。本研究で乳酸菌の受容菌として用いた *L. casei* はプロバイオティクスとしての効果を持つことが知られている。本菌は胆汁酸耐性菌であり生きてまま腸管に到達することが可能である。また、腸管内で産生する乳酸や他の生成物により、有害微生物の増殖を抑制する性質をもつ⁷⁸⁾。さらに本菌の菌体成分による効果として、免疫賦活化作用⁷⁹⁾や経口投与による癌の増殖抑制作用(制癌効果)が報告⁸⁰⁾されている。しかし、腸管への定着性は弱いことが知られており、これらのプロバイオティクスとしての効果は、経口などにより持続的に摂取し腸管に乳酸菌を届くようにさせ

る必要がある。そこで本研究で構築したプラスミドを用いて、FimH タンパク質と同じ機能をもつ融合タンパク質を産生させることで *L. casei* の有用性を高めることを目的とした。本実験で用いた *L. casei* CP680 においては、シャトルベクター pHY300PLK による宿主・ベクター系およびその形質転換条件は確立されている⁵²⁾。得られた Tc 耐性形質転換体については、プラスミドを抽出し解析した。また、形質転換体が融合タンパク質を産生することを確認するために、*E. coli* と同様に菌体タンパク質（菌体破碎液）を、ウェスタンブロッティング法に供し、目的のタンパク質の検出を行った。

実験材料

<供試菌株およびプラスミド>

供試菌株およびプラスミドは以下のものを使用した（表 6, 7）。

- *L. casei* CP680
- pYEFH01

<供試培地>

供試培地は以下のものを使用した。

- MRS 液体培地

MRS Broth (Oxoid) 5.2 g

蒸留水 100 ml で溶解し，121°Cで 15 分間高圧滅菌した。

- 受容菌調製用培地

5 mM グリシン含有 MRS 液体培地

MRS Broth (Oxoid) 5.2 g

グリシン 0.0375 g

蒸留水 100 ml で溶解し，121°Cで 15 分間高圧滅菌した。

- 形質転換体用選択培地

Tc 含有 MRS 寒天培地

MRS ager (Oxoid) 6.2 g

蒸留水 100 ml で溶解し，121°Cで 15 分間高圧滅菌した。約 50°Cまで冷却した後，Tc 溶液を 4 μ g/ml になるように添加し，滅菌シャーレに流し入れ暗所（約 30°C）で一晩乾燥した。保存する場合は，アルミホイルで遮光し，冷蔵庫で保存した。

<供試試薬>

供試試薬は以下のものを使用した。

- ・エレクトロポレーション用バッファ

シュクロース 17.1 g

10.0% (w/v) グリセロール 10.0 ml

蒸留水 100 ml で溶解し，121°Cで 15 分間高圧滅菌した。

- ・ウェスタンブロッティング用試薬

第2章で使用した SDS-PAGE 用試薬，ブロッティング用試薬，免疫染色用試薬を用いた。

実験方法

1. 構築したプラスミドによる *L. casei* CP680 の形質転換

1) エレクトロポレーションによる形質転換

L. casei CP680 のエレクトロポレーションは、Yamamoto *et al.*⁵²⁾ の報告の条件に基づいて以下のように行なった。

《受容菌の調製》

MRS 液体培地に *L. casei* CP680 を接種し、37°Cで一晩培養した（プレ培養）。このプレ培養液を 5 mM グリシン含有 MRS 液体培地 100 ml に 1%接種し、37°Cで培養した（OD₆₀₀=1.0~2.0）。培養後、4,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離し、ペレットとして得られた菌体をエレクトロポレーション用バッファー 1 ml に懸濁し、マイクロチューブに移して 6,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離した。これを 2 回繰り返して、菌体を洗浄した。最後にエレクトロポレーション用バッファー 200 μ l で懸濁し、受容菌とした。エレクトロポレーションを行なうまで、-85°Cで冷凍保存した。これまでの操作は、受容菌の調製なので無菌的に操作した。

《エレクトロポレーション》⁵²⁾

第 1 章で述べたように、プラスミド抽出用カラムキット（Quantum prep[®] plasmid mini prep kit, BIO-RAD）によって *E. coli* JM105（pYEFH01）から pYEFH01（約 1 μ g）を抽出・精製し、形質転換に用いた。

上記調製し-85°Cで保存した受容菌を氷中で融解し（約 10 分間）、TE バッファーに溶解した 5 μ l の pYEFH01 を無菌的に添加し、氷上で 10 分間程度放置した。その後、あらかじめ氷中で冷却した Gene Pulser

(BIO-RAD) 用キュベット (0.1 cm gap) に, pYEFH01 を混合した受容菌を入れ, Gene Pulser を設定し (4.0kV/cm, 25 μ F, 200 Ω), キュベットをスライダーにセットし, スライダーを Gene Pulser の電極に装着した。Gene Pulser の左のパルスボタンを押したままの状態でも右のボタンも押し, ブザーが鳴るまで押し続けた。ブザーが鳴ったらすばやく MRS 培地を 300 μ l 添加して, 37°C で 2 時間培養した。Tc 含有 MRS 寒天培地に培養液 100 μ l ずつを塗抹し, 37°C で 24~48 時間培養し Tc 耐性形質転換体を得た。

《Tc 耐性形質転換体におけるプラスミドの確認》

得られた Tc 耐性形質転換体を用いて, プラスミド抽出用カラムキットによりプラスミドを抽出した。本形質転換体は乳酸菌であり細胞壁のタンパク質は *E. coli* より多いので, 溶菌しやすいようにあらかじめ細胞懸濁液にリゾチウム (最終濃度 5 mg/ml) を添加して, プラスミド抽出を行なった。他の手順は, 第 1 章と同じく行なった。抽出したプラスミドは, アガロースゲル電気泳動により確認した。

《COMPACT BIS (アマシャム ファルマシア) によるゲルの撮影》

COMPACT BIS 本体背面の電源 (図 15⁸¹⁾) を入れ, モニターに

“PLEASE WAIT FOR INITIALIZATION”

と表示され, 約 10 秒後にイニシャライゼーションが終了する。その後絞りを開け (図 16-B), トランスイルミネーターの電源を入れる。ズームとフォーカスをまわし (図 16-B), ゲルの大きさに合わせて微調整する。カメラコントロールのプリセットボタン 1 (図 16-A) を押し, パラメーターを TIME : 1sec, GAIN : 5, Black level (B. LEV) : 5 にそ

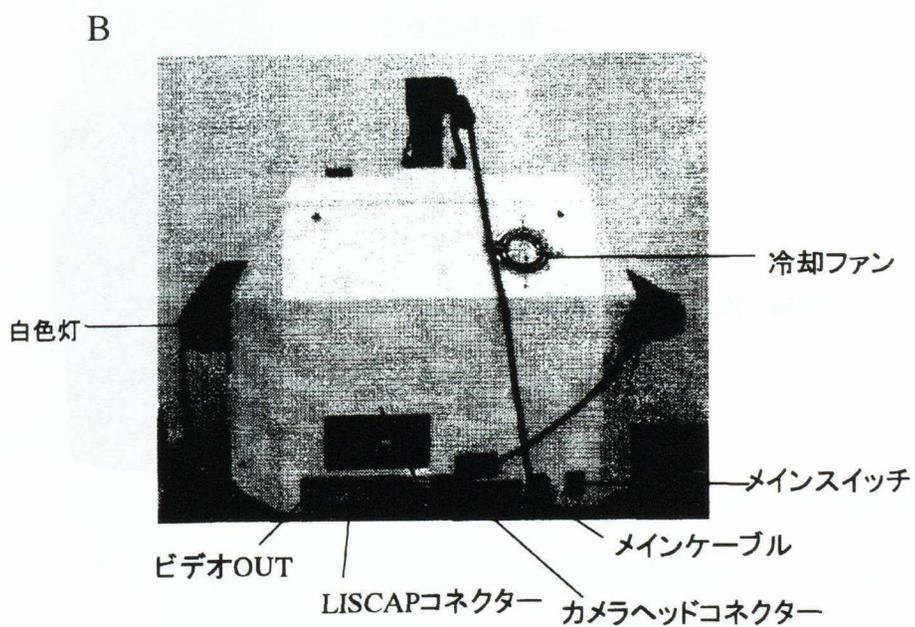
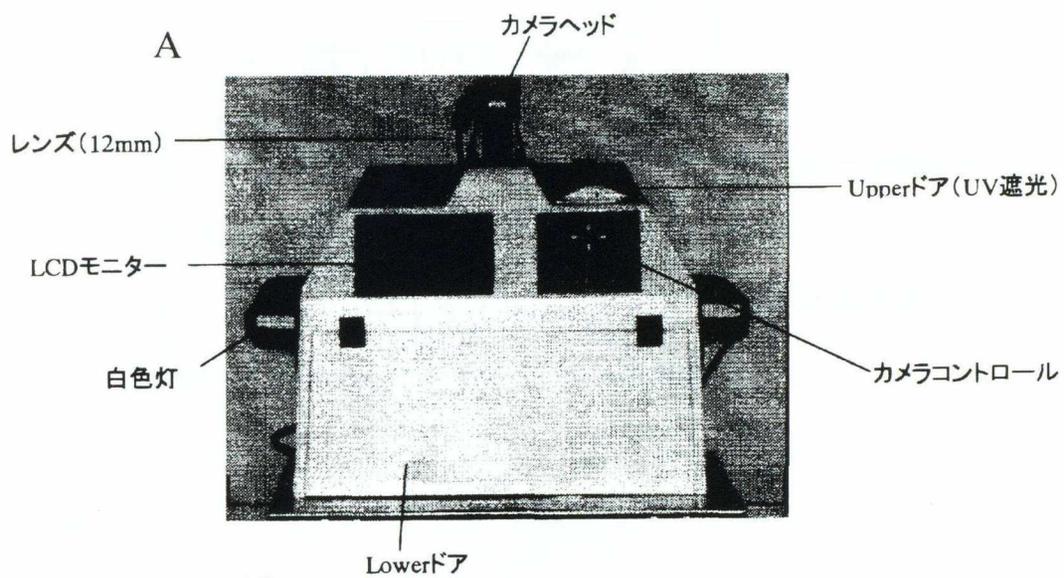
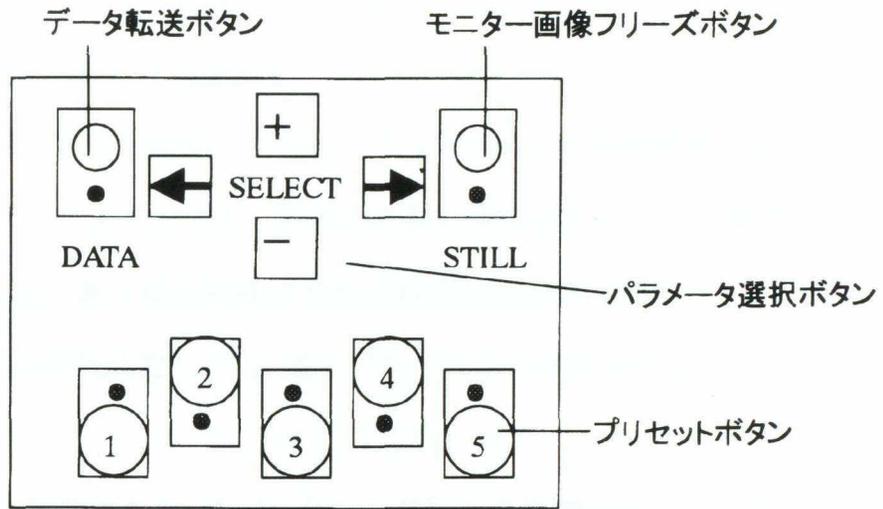


図 15. COMPACT BIS 本体各部の名称⁸¹⁾

A : 本体前部

B : 本体後部

A



B

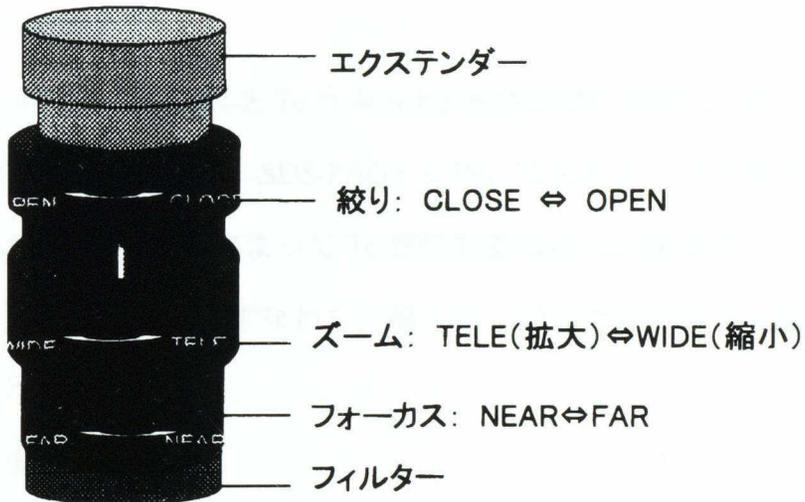


図16. カメラとコントローラー各部の名称⁸¹⁾

A: カメラコントローラー

B: カメラとレンズ

れぞれ調節した。本体に接続されているプリンタ (FTI-500, FUJIFILM) のプリントボタンを押して、画像をプリントした。

《制限酵素消化による確認》

Tc 耐性形質転換体より抽出した pYEFH01 を制限酵素 *Spe* I および *Bpu*1102 I により消化し、切り出された遺伝子のサイズを確認した。具体的には、第 1 章と同様にそれぞれの制限酵素で消化し、再度アガロースゲル電気泳動し *fimH* 遺伝子かどうかの確認を行なった。

2. 乳酸菌で産生された **FimH** タンパク質を含む融合タンパク質のウェスタンブロッティング法による検出

2) ウェスタンブロッティング法

《SDS-PAGE》

Tc 耐性形質転換体を Tc 含有 MRS 液体培地に接種し、得られた培養菌体を超音波破碎し、SDS-PAGE に用いる菌体タンパク質のサンプルとした。SDS-PAGE によって Tc 耐性形質転換体の菌体タンパク質を各分子量に分離した。すなわち、第 2 章と同じ条件で行なった。

《免疫染色》

ニトロセルロースメンブレンを用いて、分離したタンパク質をブロッティングした。*E. coli* での試験と同様に、抗 FimH マウス血清および抗 PrtY マウス血清を用いて、ニトロセルロースメンブレンに転写したタンパク質を反応させ、融合タンパク質の検出を行なった。

結果および考察

L. casei CP680 の形質転換

本実験で用いたベクターpHY300PLKは、*Bacillus subtilis*での形質転換頻度は非常に高いものの、乳酸菌での形質転換ではかなり菌種菌株によってその条件が違うようである。*L. casei* CP680の形質転換条件はすでにYamamoto *et al.*⁵²⁾によって確立されているので、その方法の条件に従って形質転換を行なったところ、Tc耐性形質転換体が5コロニーが得られた。これらの菌株からプラスミドを抽出し、制限酵素 *Spe* I で消化し、1ヶ所で切断することで構築したプラスミドの分子量を確認した(図17)。その後、このリニアのプラスミドをさらに *Bpu*1102 I で消化し、アガロースゲル電気泳動したところ、すべての菌株から pYEFH01 から切り出された *fimH* 遺伝子断片 (680 kb) を確認でき(図18)、pYEFH01により *L. casei* CP680 が形質転換されたことが認められた。

乳酸菌の菌体内で pYEFH01 が検出されたので、*L. casei* においても細胞附着性機能をもつ融合タンパク質が産生しているものと考えられる。すなわち、*prtY* 遺伝子由来のプロモーターを用いたので、乳酸菌の菌体内で融合タンパク質が合成され、シグナル配列とアンカー配列の間に組み込まれた *fimH* 遺伝子が発現することで産生された融合タンパク質は、乳酸菌の細胞壁を通過して菌体外へ放出され、菌体表層に固定されるものと推測できる。

次に、得られた Tc 耐性形質転換体 *L. casei* CP680 (pYEFH01) において、融合タンパク質が産生されていることを確認するために、この Tc 耐性形質転換体の菌体を破碎し、菌体タンパク質をウェスタンブロッティング法に供した。手順としては第2章と同様に、菌体タンパク質を SDS-PAGE に

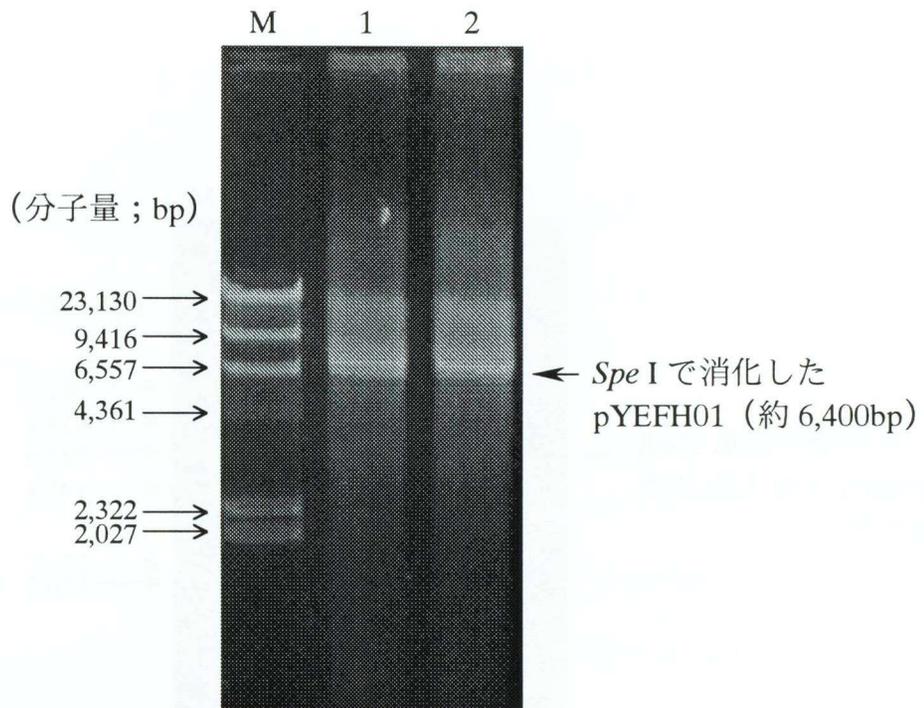


図 17. *L. casei* CP680 (pYEFH01) より抽出したプラスミド
 レーン M : λ -*Hind* III digest 分子量マーカー
 レーン 1, 2 : *Spe* I で消化した pYEFH01

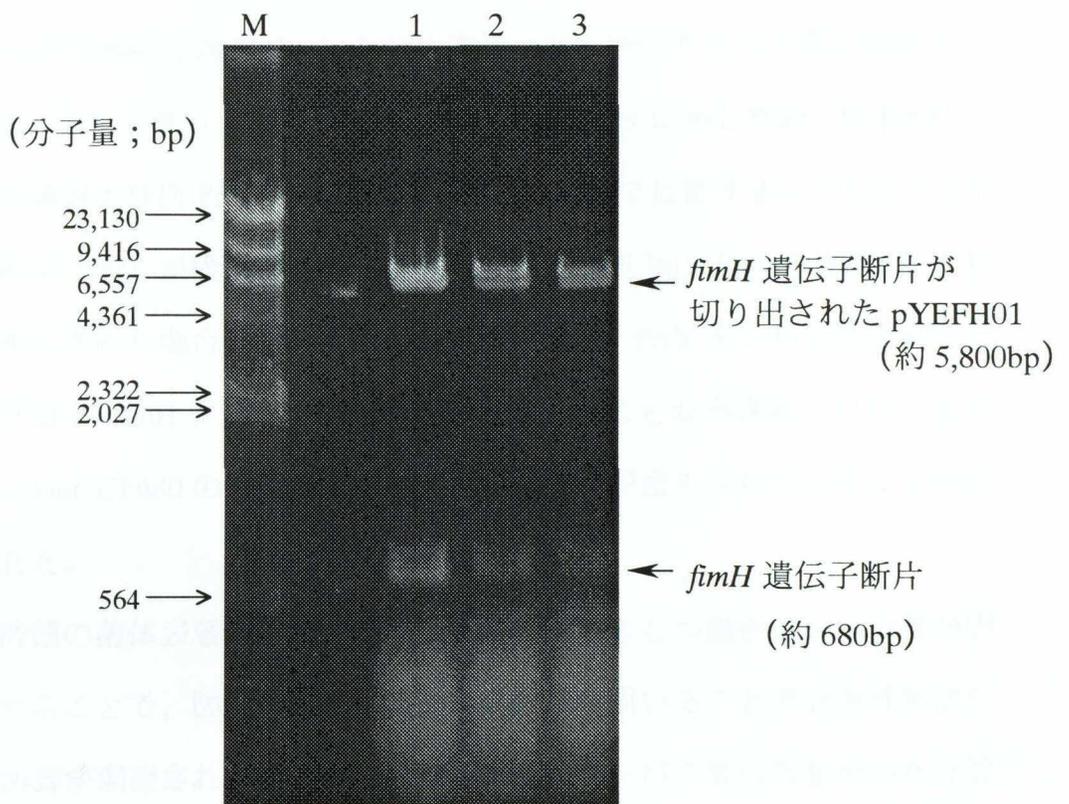


図 18. *L. casei* CP680 (pYEFH01) より抽出したプラスミド

レーン M : λ -*Hind* III digest 分子量マーカー

レーン 1, 2, 3 : 抽出したプラスミドを *Spe* I および *Bpu*1102 I で
消化したもの

より分離し、ニトロセルロースメンブレンへ菌体タンパク質を転写した。転写されたタンパク質に抗 FimH マウス血清および抗 PrtY マウス血清を反応させて、融合タンパク質の検出を行なった。

細胞付着性機能をもつ融合タンパク質のウェスタンブロットティング法による検出

L. casei CP680 (pYEFH01) の菌体破碎液より融合タンパク質の検出を行なった。ウェスタンブロットティングの結果は図 19 に示したが、抗 FimH マウス血清および抗 PrtY マウス血清の両者によって反応する一つバンド(分子量約 40,000) が検出された。この結果は *E. coli* JM105 (pYEFH01) において産生された融合タンパク質の結果と一致し、PrtY タンパク質由来のタンパク質と FimH タンパク質が産生されていることが示され、このことから *L. casei* CP680 の菌体内で、融合タンパク質が産生されていることが認められた。

乳酸菌の菌体表層に FimH タンパク質の機能をもつ融合タンパク質が固定されることで、図 5 のように組換え乳酸菌を用いることで病原性細菌の感染防御が期待される。具体的には、FimH タンパク質抗体を用いた付着阻害試験⁶⁴⁾ では、生体外での実験において、酵母細胞との Type 1 線毛をもつ *E. coli* の凝集が阻害され、同じ抗体を用いた尿路感染モデル(生体内) マウスを用いた実験では、FimH タンパク質抗体を膀胱に投与すると、Type 1 線毛をもつ *E. coli* による膀胱上皮への付着が有意に阻害されることも報告されている。これは、FimH タンパク質のエピトープ部分に抗体が結合することで、Type 1 線毛をもつ *E. coli* 膀胱上皮や酵母細胞への付着を阻害したと示唆される。このように、抗体によってアドヒジエンタンパク質の付着性を阻害できるので、融合タンパク質を産生する組換え乳酸菌の付着

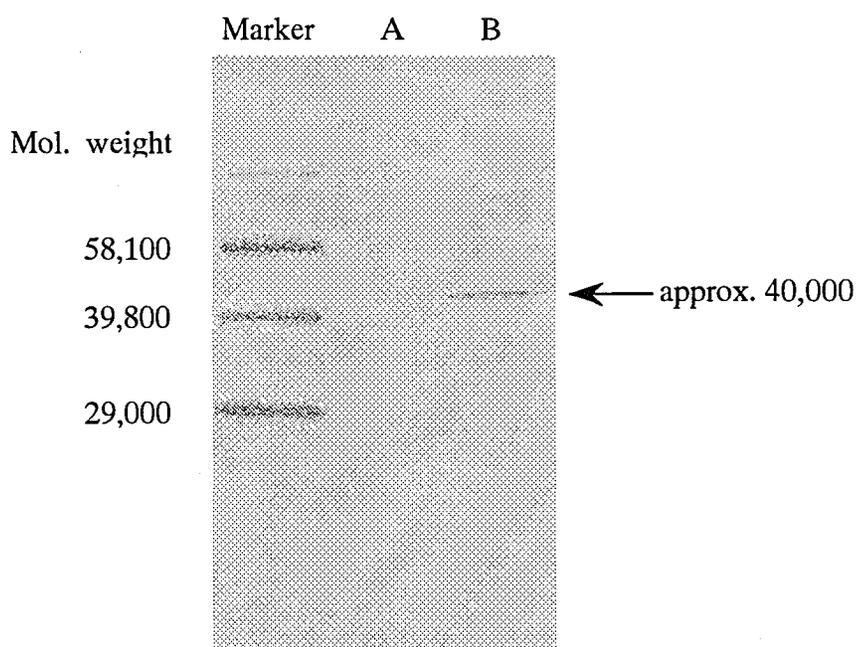


図 19. ウェスタンブロッティング法 (抗 FimH マウス血清) による
L. casei CP680 (pYEFH01) の融合タンパク質の検出

A : *L. casei* CP680

B : *L. casei* CP680 (pYEFH01)

によって宿主の細胞表面を塞ぐことで、病原性細菌のレセプターをもつ細胞への付着を阻害するものと考えられる。また、プロバイオティクスとしてこの組換え乳酸菌を用いる場合も、宿主の細胞表面への付着性が向上することで、宿主にとってさらに有用な効果（腸内細菌叢の改善や免疫賦活化など）が発揮されると期待される。

今後、作出した組換え乳酸菌について、融合タンパク質の局在（菌体表層か菌体内かなど）を確認する必要がある。その方法として、病原性細菌や細胞表面への付着を確認するために用いられる電子顕微鏡^{52, 82-85)}や腸管出血性大腸菌 O-157:H7 の植物細胞への付着試験の報告⁸⁶⁾ で用いられた蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡⁸⁷⁾での検鏡が考えられる。その中でも共焦点レーザー顕微鏡は、細胞や組織の光学的切片像をとらえることができるので、薄切片の作成をする必要がなく、生きた細胞や組織にも応用が可能であると考えられている。Type 1 線毛のように産生量が十分で、長さがある程度あれば、電子顕微鏡でタンパク質の画像としてとらえられているが、本研究で産生させる融合タンパク質の画像をとらえるには、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡などによる融合タンパク質の局在を考慮した菌体細胞観察が必要であると考えられる。

今後の展望

これまで述べてきたように、乳酸菌と病原性細菌は、宿主の細胞表面への付着機構である線毛アドヒゼンタンパク質の有無や付着する際に認識する糖鎖が異なり、結果的に同宿主内での棲み分けがなされていると考えられる。それぞれの細菌について付着機構からの研究が進んでおり、乳酸菌においても多々報告（表 4, 5）されてきてはいるが、病原性細菌の感染防御機構を検討すると、レセプターとして認識される糖鎖がほぼ菌種の

数だけ宿主の細胞表面に存在すると言っていいほどであり、各種乳酸菌を用いて一つ一つ競合阻害試験を行なうのは困難である。そこで本研究で行なったアプローチ、すなわち特定の病原性細菌の付着機構をターゲットにし、その病原性細菌がもつアドヒジユンを融合タンパク質として菌体表層に産生した乳酸菌を作出し、その乳酸菌により付着性競合阻害の原理により病原性細菌を排除し、さらに乳酸菌自らが定着することで感染を防御し、プロバイオティクスとして宿主に有用性をもたらすことが期待できる。

乳酸菌の健康的意義⁸⁸⁾として、発酵乳がヒトの健康に及ぼす効果は、乳酸発酵による乳成分の栄養的価値の向上、生きている乳酸菌が発揮する生理的効果、乳酸菌の発酵生産物または菌体の有する生理的効果などがあげられる。生きている乳酸菌が腸内細菌叢を改善し、好ましい整腸作用を発揮する効果としては、腸管に届いて定着する乳酸菌やビフィズス菌が利用され、商業的にもこれらの細菌を添加した発酵乳・乳酸菌飲料が普及している。乳酸菌の発酵生産物や菌体成分の有する生理的効果の例^{2,89)}として、*L. helveticus* で作った酸乳に血圧降下作用が認められる。これは、 β -カゼインから本菌のプロテイナーゼやペプチダーゼの作用で生成されるトリペプチド (Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro) がアンジオテンシン変換酵素を阻害する活性を有するためであることが明らかにされた。これらトリペプチドを含む乳製品乳酸菌飲料 (殺菌) は血圧が高めのヒトに適した食品として特定保健用食品の許可が得られている。一方、乳酸菌の菌体や多糖による抗腫瘍作用は、癌細胞を直接破壊するものではなく宿主の生体防御機構を高めることによって、癌細胞の増殖を抑えるものである。

現在、ヒトに対するプロバイオティクスとして乳酸菌に望まれる条件は次のとおりである⁹⁰⁾。乳酸菌の腸管付着性が特異的であるのでヒト由来であること、生きた状態で腸管に到達できるよう、胃酸と胆汁に抵抗性をも

つこと、他の病原性細菌の生育を抑制するよう抗菌性物質を生成すること、食品または臨床的に用いた場合に安全であること、臨床的に確認された保健効果があること、加工および貯蔵中に安定であることなどがあげられる。特に安全性の確認は絶対不可欠な事項である。

プラスミドによる乳酸菌の形質転換は、分子育種学的手法の1つで有用形質遺伝子の導入法として確立されている。つまり、プラスミドとして組み込んだ遺伝子を発現させ、タンパク質を産生させる方法はよく用いられている。乳酸菌は、さまざまな表現形質をコードしているプラスミドを複数保持している場合が多く、自然界では接合伝達などの遺伝子交換に重要な役割を担っている。本実験では融合タンパク質をコードする遺伝子を、染色体 DNA へ組み込むのではなく、プラスミドとして構築、導入を試みた。染色体 DNA へ組み込んだ場合、その場所によっては思わぬタンパク質が産生されたり、それにより宿主の性質が変わる場合も考え得るが、プラスミドは染色体 DNA とは別に単独で複製しタンパク質を産生するので、主な性質が変わることは考えがたい。生体内 (in vivo) での組換え乳酸菌の性質はまだ確認していないが、*L. casei* CP680 の形質転換体についてコンタミネーションではないことの確認のためにその性質（形態など）は調べており、本形質転換体は *L. casei* CP680 とほぼ一致する性質を有していることを確認している。

また、有用形質をコードしているプラスミドの構築は、他の乳酸菌へも応用が期待され、形質転換による遺伝子の導入が研究されており、本研究において構築したプラスミドも、乳酸菌において複製することから融合タンパク質を産生し、プロバイオティクス乳酸菌として組み換えられることが示唆された。しかし、乳酸菌の利用範囲は主として食品であり、人々の食生活に深くかかわっているため、乳酸菌の遺伝子操作による組換え体の

実用化については、社会的コンセンサスが得られる安全性評価の手法を確立し、科学的基盤に立った情報の提供に努めなければならない。

現在、植物であれば害虫に対する耐性能や完熟になるのを遅らせる遺伝子を組み込んだ作物が商品としてその旨を明記した上で市場に出ている⁹¹⁾。また、チーズ製造の際に用いる凝乳酵素キモシンは、大腸菌にキモシン産生遺伝子を組み込んで、大量に、かつ安価に製造し商品化されている⁹²⁾。死菌であれば組換え体使用を表記することで食品に応用は認可されているが、生体の組換え体はまだその安全性を検討中である。ヒトや動物の腸管内では接合伝達などによる遺伝子交換が起こることが証明されており、安全な細菌由来の遺伝子のみを用いた組換え体を作成し、生菌としての摂取を試みるのが厚生省や農水省を中心として検討されている^{91,92)}。生菌を摂取することで効果が最も期待されているものの1つに乳酸菌があり、組換え体のスクリーニングに従来の薬剤耐性マーカーを用いない生育要求性に関する遺伝子など、安全な選択マーカーでの宿主-ベクター系確立の試みがなされている⁹³⁾。また今回のように薬剤耐性をマーカーとした場合も、二重交叉法 (double crossover) により薬剤耐性マーカー遺伝子を除去できる手法が確立されている⁹⁴⁾ので、今回用いた薬剤耐性マーカー遺伝子を切り出す (除去する) ことも可能である。

病原性細菌において、アドヒジュンタンパク質をコードしている遺伝子についてかなり研究されている (表2)。病原性細菌の多くは菌体表面にアドヒジュンタンパク質を含む線毛をもっているため、この線毛の分類からコードされている遺伝子群の解析まで、医学・獣医学の方面を中心として詳細に報告されている^{26,82-85,95)}。これは、ヒトや動物に対する感染症対策の研究によるものがほとんどである。感染症の原因細菌が特定され、その感染経路や感染症として発症するまでの機構 (細菌の付着→定着→感染)

が解明されれば、その防御対策が検討でき、また、感染した場合の治療方法を検討することができる。ここで注目したいのは、医療機関において感染症の治療として多大な効果を現しているのは抗生物質である。現在、感染症に対する一般的な治療において、多くの種類と量の抗生物質が使われており貢献度は高い。しかし一方で、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) のように、多くの抗生物質に対し耐性を示し⁹⁶⁾、院内感染症の原因細菌となるものも多い。最近、最も期待の大きいバンコマイシンについても耐性菌がみつまっている⁹⁷⁾。また、抗生物質を用いることで、病原性細菌は殺菌されるが、菌体内に毒素を産生しているものもあり、殺菌のメカニズムで溶菌されると、菌体内毒素が放出され宿主に暴露される¹³⁾ こと (たとえば、腸管出血性大腸菌 O-157:H7^{98,99)} など) も知られている。このような理由で抗生物質感受性の細菌に対しても、抗生物質による排除ができない場合も生ずる。こうした時に、本研究でのアプローチである融合タンパク質を産生する乳酸菌を用いることによって、今後、生体内での試験が重要であるが、ターゲットを定めた病原性細菌の宿主細胞への付着を競合阻害することで、殺菌せずに排除することが期待できる。

本研究の成果として、pYEFH01 の応用可能な例を次に述べる。病原性細菌の一種である *Salmonella typhimurium*¹⁰⁰⁾ は、Type 1 線毛遺伝子を有するが *E. coli* との相同性はほとんどない。本菌のアドヒジュンタンパク質遺伝子のシーケンスより *Spe* I と *Bpu*1102 I サイトを含むプライマーを構築し (フォワードプライマー; 5' - CAACTAGTATCCGTCCGGCGTCATAA AAGG - 3', リバースプライマー; 5' - TGGCTCAGCGGGCTGAACAAAA CACAACCG - 3'), PCR 増幅された産物を両制限酵素により消化すれば図 20 に示したように pYEFH01 に容易に組み込め、この遺伝子の発現が可能となる。すなわち、病原性細菌のアドヒジュンタンパク質が遺伝子レベル

Met

19

Forward primer

TGTATCGCCCTTACGCCCTGGCGGAGGATAGCCTGAAGCAGGGGATTACGATAGCCAGCGCAACCTGTATCCGTCGGCGTCATAAAAGGAAAAATAGAGAIGAAAAATATACTCAGCGC

139

TATTGCTGGCGGGACCGCGCTCTTTTCCACCCATCCCGCGCTGGCGACGGTTGCCGTAATTCAAACGGGACGGGACCGGATATCTTTTACGACCTGTCAGATGTTTTCCACCGCGGCA

979

ATAATCAGCGGGACAGGTGGTGA..... CGGGGAAAGGCGGTTACTGCGC

Reverse primer

GCGGCTATCTACGAGTCGATTATGATTAAGGAGGATAATGATCCTTCGGCGCGTTTCATCGGTATCGGTGGTTTGTTCAGCCCGCTGAGTCAGGCCCAACTCATCTCTGGGCGAAG

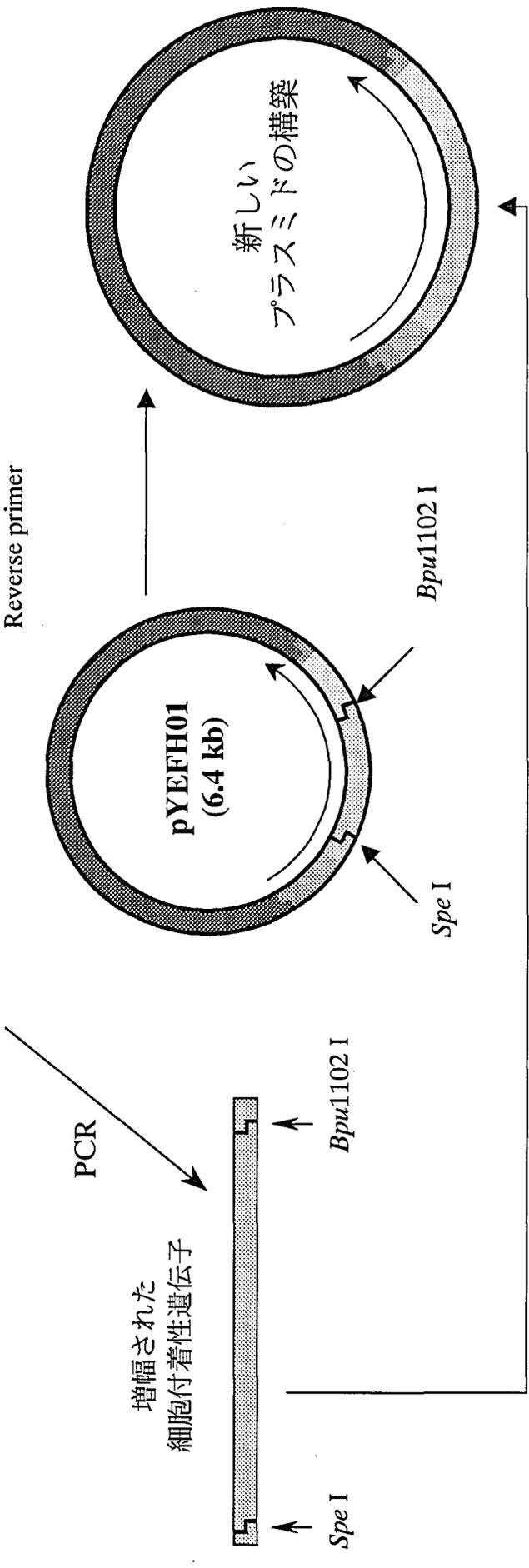


図20. *Salmonella typhimurium*のType 1線毛遺伝子と乳酸菌での発現遺伝子の構築

で解明されているため、本研究で構築した pYEFH01 のドメインにいろいろな細菌のアドヒゼンタンパク質をコードした遺伝子を組み込み乳酸菌に導入することで、産生された融合タンパク質はそれぞれ病原性細菌と同じレセプターに付着し、宿主の細胞表面への付着を競合阻害させる試みである。このように病原性細菌の付着因子の遺伝子を、本研究で構築したプラスミドに組み込んだ組換え乳酸菌を作出することによって、病原性細菌と同じレセプターに付着する融合タンパク質を菌体表層にもち、病原性細菌の付着による感染防御や、プロバイオティクス乳酸菌としてヒトや動物の腸内細菌叢の改善・免疫賦活化の効果を期待することも考え得る。

要 約

乳酸菌の一種である *L. casei* CP680 を pYEFH01 により形質転換し、Tc 耐性形質転換体 *L. casei* CP680 (pYEFH01) を得た。得られた Tc 耐性形質転換体について、*E. coli* を宿主とした時と同様に、プラスミドの解析とウェスタンブロッティング法による融合タンパク質の検出を試みた。

本形質転換体からプラスミドを抽出し *Spe* I と *Bpu*1102 I で消化したところ、アガロースゲル電気泳動によりプラスミド全体の分子量 (約 6,400bp) と *fimH* 遺伝子断片 (約 680bp) を認めた。

また *L. casei* CP680 (pYEFH01) の菌体タンパク質を SDS-PAGE によって各分子量に分離し、ウェスタンブロッティング法に供した。抗 FimH マウス血清で反応させた結果、*E. coli* の場合と同様に、分子量約 40,000 の位置のバンドを検出した。抗 PrtY マウス血清でも同じ分子量のバンドを検出でき、乳酸菌においても FimH タンパク質をドメインにもつ融合タンパク質が産生されていることを証明した。

以上のことから、*L. casei* においてマンノースをレセプターとして付着する、融合タンパク質遺伝子を発現させるためのプラスミド pYEFH01 が構築できた。産生されたこの融合タンパク質は、同じマンノースを認識し付着する *E. coli* を競合阻害することが認められた。

総括

大腸菌などの病原性細菌によるヒトや動物の上皮細胞への付着については多くの共通性がみられ、哺乳動物など宿主の細胞表面の糖鎖をレセプターとして特異的に付着し増殖（定着）することによって感染症が引き起こされる。*E. coli* のもつ Type 1 線毛の先端には付着因子（アドヒジュンタンパク質）である FimH タンパク質が存在し、宿主の細胞表面に存在するマンノースをレセプターとして付着する。アドヒジュンタンパク質を欠損させた *E. coli* では、付着性が著しく損なわれ、また感染症を発症しないことも知られることから、このタンパク質は *E. coli* が宿主の細胞へ付着し、感染するための重要な因子として研究されている。

一方、乳酸菌が哺乳動物など（宿主）の腸管上皮細胞に付着することは、種々報告されているが、その付着因子や付着強度などについての統一的な見解はほとんどみられない。乳酸菌をプロバイオティクスとして利用するために、宿主の細胞表面への付着性が重要となる。そこで明らかにされている *E. coli* 由来 FimH タンパク質をコードした *fimH* 遺伝子（Klemm *et al.* 1987）を乳酸菌で発現させることにより、宿主の細胞表面への付着性を高めることが推測できる。また、病原性細菌と同じ付着因子を乳酸菌が産生することにより、病原性細菌の付着を競合阻害することが期待される。

本研究では、宿主細胞表面への乳酸菌の付着性向上および乳酸菌と病原性細菌との付着競合阻害を目的とし、*E. coli* 由来 Type 1 線毛の FimH タンパク質を乳酸菌で産生させるために、*Lactobacillus helveticus* CP790 株のプロティナーゼ (*prtY*) 遺伝子（Yamamoto *et al.*, 2000）を応用した。すなわち、*prtY* 遺伝子はプロモーターを有し、菌体内で産生されたドメインであるタンパク質を菌体外へ放出させるシグナル配列と、そのタンパク質を菌体表層に固定するアンカー配列を含んでいる。グラム陽性・陰性菌のシャトルベクターでテトラサイクリン（Tc）耐性遺伝子をコードした

pHY300PLK (Takara) を用いてこの *prtY* 遺伝子をサブクローニングし, *prtY* 遺伝子のドメインに *fimH* 遺伝子を組み込むことによって, FimH タンパク質の機能をもつ融合タンパク質を産生させることを試みた。

第1章では, *E. coli* と乳酸菌の両者において融合タンパク質を産生させるためのプラスミドの構築を行なった。はじめに *prtY* 遺伝子のプロモーター上流のシーケンスを決定し, プロモーターを含み PCR 増幅した *prtY* 遺伝子を pHY300PLK の *Bam*H I と *Xba* I サイトに組み込み, pY790 を構築した。次に pY790 の *prtY* 遺伝子内の *Spe* I と *Bpu*1102 I で切断されるドメイン (約 800 bp) を除去した後, 両制限酵素サイト (配列中の下線部) を含むプライマー (フォワードプライマー; 5' - TGCCTGGTCATTCACTAGT AAAACCGCCAA - 3', リバープライマー; 5' - TCGCTGGAATAAGCTTAGCGTTGCGCGTCA - 3') で PCR 増幅した約 680 bp の *fimH* 遺伝子を組み込んだ (pYEFH01 の構築)。この pYEFH01 をシーケンスし, *prtY* 遺伝子のドメインにフレームが合うように *fimH* 遺伝子が組み込まれているのを確認した。このプラスミドは *E. coli* と乳酸菌で *fimH* 遺伝子を発現し, 融合タンパク質を産生するものと考えられた。

第2章では, pYEFH01 を *E. coli* JM105 に導入し Tc 耐性形質転換体 *E. coli* JM105 (pYEFH01) を得た。本形質転換体の菌体タンパク質をウェスタンブロッティング法に供し抗 FimH マウス血清および抗 PrtY マウス血清を用いて融合タンパク質の検出を行なった。その結果, 抗 FimH マウス血清に反応するタンパク質 (分子量約 40,000) のバンドを検出した。また同じタンパク質のバンドが, 抗 PrtY マウス血清で反応したため, 目的の FimH タンパク質をドメインを含む融合タンパク質が産生されたことを確認した。

また融合タンパク質の機能を解析するために *E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体タンパク質 (菌体破碎液) を用いて, Type 1 線毛をもつ *E. coli* ORN103

(pSH2) (Tawari, Ikeda and Abraham *et al.* 1993) のヒト結腸線癌由来 Caco-2 細胞への付着阻害試験を行なった。その結果、*E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体タンパク質の添加により *E. coli* ORN103 (pSH2) の付着が阻害された(付着率:16%減少)。このことから、産生された融合タンパク質が Caco-2 細胞への付着性を有し、結果的に *E. coli* ORN103 (pSH2) の Caco-2 細胞への競合阻害することが認められた。*E. coli* JM105 (pYEFH01) は、FimH タンパク質と同じ機能を示す融合タンパク質を菌体内で産生していることが示唆された。

第3章では、乳酸菌の一種である *Lactobacillus casei* CP680 を pYEFH01 により形質転換し、Tc 耐性形質転換体 *L. casei* CP680 (pYEFH01) を得た。得られた Tc 耐性形質転換体について、*E. coli* を宿主とした時と同様に、プラスミドの解析とウェスタンブロッティング法による融合タンパク質の検出を試みた。本形質転換体からプラスミドを抽出し *Spe* I と *Bpu*1102 I で消化し、*fimH* 遺伝子断片を認めた。また *L. casei* CP680 (pYEFH01) の菌体タンパク質をウェスタンブロッティング法に供し、抗 FimH マウス血清で反応させた結果、*E. coli* の場合と同様に、分子量約 40,000 の位置のバンドを検出した。抗 PrtY マウス血清でも同じ分子量のバンドを検出でき、乳酸菌においても FimH タンパク質をドメインにもつ融合タンパク質が産生されていることを証明した。

以上、*L. casei* においてマンノースをレセプターとして付着する、融合タンパク質遺伝子を発現させるためのプラスミド pYEFH01 が構築できた。産生されたこの融合タンパク質は、同じマンノースを認識し付着する *E. coli* を競合阻害することが認められた。本研究の成果として、pYEFH01 の応用可能な例も次のように考えられる。病原性細菌の一種である *Salmonella typhimurium* は、Type 1 線毛遺伝子 (Clegg *et al.*, 1995) を有するが *E. coli* と

の相同性はほとんどない。本菌のアドヒジュンタンパク質遺伝子のシーケンスより *Spe* I と *Bpu*1102 I サイトを含むプライマーを構築し、PCR 増幅された産物を両制限酵素により消化すれば pYEFH01 に容易に組み込み、この遺伝子の発現が可能となる。すなわち、病原性細菌のアドヒジュンタンパク質が遺伝子レベルで解明されているため、本研究で構築した pYEFH01 のドメインにいろいろな細菌のアドヒジュンタンパク質をコードした遺伝子を組み込み乳酸菌に導入することで、産生された融合タンパク質はそれぞれ病原性細菌と同じレセプターに付着し、宿主の細胞表面への付着を競合阻害し得るものと考えられた。

謝 辞

本研究の実施および論文作成にあたり、麻布大学 獣医学部 動物応用科学科 食品科学研究室の坂田亮一教授ならびに森田英利助教授の多大なるご助力とご指導をいただいたことに、厚く御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、多大なるご助言を賜りました同学科 比較毒性学研究室の政岡俊夫教授ならびに同学部 獣医学科 衛生学の第一研究室 押田敏雄教授に、心より感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり、本大学 名誉教授 永田致治博士のご尽力により研究計画が滞りなく実現されましたことに、感謝の意を表します。

実験に際し、試料のご提供および実験方法についてのご指導、有益なるご助言等賜りました同学部 獣医学科 微生物第一研究室の池田輝雄助教授ならびに Duke University Medical Center の Soman N. Abraham 博士に深く感謝申し上げます。

本研究における多数の実験に際し、カルピス（株）基盤技術研究所 高野俊明所長、研究開発室の山本直之副部長ならびに篠田 直氏に、試料・試薬のご提供、また方法についての多大なるご支援と有益なるご助言等賜りましたことに深く御礼申し上げます。

本研究を行なうにあたり、本食品科学研究室の大学院生、四年生、三年生の皆さんの多大なるご協力と友情に感謝いたします。

最後に、麻布大学大学院 獣医学研究科 動物応用科学専攻 博士後期課程において研究を行なうにあたり、暖かく見守り支えていただいた両親に、深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 桜井稔三・森地敏樹, 乳酸菌の科学と技術. 乳酸菌の一世紀の項執筆. 乳酸菌研究集談会編. 第1版. 1-7. 学会出版センター. 東京. 1996.
- 2) 中村康則・高野敏明, 乳酸菌の科学と技術. 栄養生理機能の項執筆. 乳酸菌研究集談会編. 第1版. 311-321. 学会出版センター. 東京. 1996.
- 3) Fuller, R., Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**: 365-378. 1989.
- 4) 横倉輝男, 乳酸菌の科学と技術. 乳酸菌の医薬品としての利用の項執筆. 乳酸菌研究集談会編. 第1版. 334-336. 学会出版センター. 東京. 1996.
- 5) 佐古知行, "Prolongation of Life"から"Quality of Life"へ—ヨーロッパにおけるプロバイオティクス研究の現状—, 乳酸菌学会誌, **11**: 87. 2000.
- 6) 向井孝夫・戸羽隆宏, プロバイオティクス乳酸菌による病原微生物の感染防御は可能か?—上皮細胞への付着機構からその可能性を探る—, *New Food Industry.*, **38**: 17-24. 1996.
- 7) 一山 智, 感染症. 病原微生物(総論)の項執筆. 一山 智・丸山征郎編. 第1版. 21-27. メディカルレビュー社. 東京. 2000.
- 8) 武田誠司・向野賢治, 感染症. 感染経路の項執筆. 一山 智・丸山征郎編. 第1版. 41-49. メディカルレビュー社. 東京. 2000.
- 9) 竹田美文, 腸内フローラシンポジウム3—腸内フローラと腸内増殖. 腸管系病原菌の腸内定着. 光岡知足編. 第1版. 1-9. 学会出版センター. 東京. 1997.
- 10) 藤田 修・内貴正治, 病原性細菌の糖鎖受容体—病原性大腸菌感染症対策—, バイオサイエンスとインダストリー, **155**: 181-186. 1997.
- 11) Smith, H. W. and M. A. Linggood, Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine

- diarrhoea. *J. Med. Microbiol.*, **4**: 467-85. 1971.
- 12) Satterwhite, T. K., D. G. Evans, H. L. DuPont and D. J. Evans, Role of *Escherichia coli* colonisation factor antigen in acute diarrhoea. *Lancet.*, **2**: 181-4. 1978.
 - 13) 山本達男, 毒素産生菌とその感染症. 毒素原性大腸菌感染症の項執筆. 竹田美文・本田武司編. 第1版. 202-216. 医薬ジャーナル社. 大阪. 1998.
 - 14) Klemm, P., I. Orskov and F. Orskov, F7 and type 1-like fimbriae from three *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections : protein chemical and immunological aspects. *Infect. Immun.*, **36**: 462-468. 1982.
 - 15) Klemm, P. and K. A. Krogfelt, Type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. in Fimbriae adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines. Vol. 1. (Klemm, P., ed.) 9-26. 1994.
 - 16) Clegg, S. and D. L. Swenson, *Salmonella* fimbriae in Fimbriae adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines. Vol. 1. (Klemm, P., ed.) 105-113. 1994.
 - 17) 木幡 陽, 糖鎖工学. 糖タンパク質の糖脂質工学 総論の項執筆. 糖鎖工学編集委員会編. 第1刷. 12-18. 産業調査会バイオテクノロジー情報センター. 東京. 1992.
 - 18) 古川 清, 糖鎖:1. 糖鎖と生命の項執筆. 永井克孝編. 第1版. 105-116. 東京化学同人. 東京. 1994.
 - 19) Wold, A. E., J. Mestecky, M. Tomana, A. Kobata, H. Ohbayashi, T. Endo and C. S. Eden, Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect. Immun.*, **58**: 3073-3077. 1990.
 - 20) Saltzman, D. A., E. Katsanis, C. P. Heise, D. E. Hasz, S. M. Kelly, R. Curtiss, A. S. Leonard and P. M. Anderson, Patterns of hepatic and splenic colonization by an attenuated strain of *Salmonella typhimurium* containing the gene for human interleukin-2: a novel anti-tumor agent. *Cancer Biother Radiopharm.*, **12**: 37-45. 1997.

- 21) 木村博久・内貴正治, 糖鎖工学. 糖脂質工学と微生物の項執筆. 糖鎖工学編集委員会編. 第1刷. 197-204. 産業調査会バイオテクノロジー情報センター. 東京. 1992.
- 22) 福田 穰, 糖鎖工学. 糖鎖の構造解析法の項執筆. 糖鎖工学編集委員会編. 第1刷. 32-46. 産業調査会バイオテクノロジー情報センター. 東京. 1992.
- 23) 小川智也・木幡 陽・渋谷直人・永井克孝・鈴木 旺, 糖鎖工学. 糖鎖工学とは—その成立と特徴の項執筆. 糖鎖工学編集委員会編. 第1刷. 1-9. 産業調査会バイオテクノロジー情報センター. 東京. 1992.
- 24) Johansson, M.-L., G. Molin, B. Jeppson, S. Nobaek, S. Ahrne and S. Bengmark, Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 15-20. 1993.
- 25) Alander, M., R. Korpela, M. Saxelin, T. Vilpponen-Salmela, T. Mattila-Sandholm and A. von Wright, Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**: 361-364. 1997.
- 26) Adlerberth, I., S. Ahrne, M.-L. Johansson, G. Molin, L. A. Hanson and A. E. Wold, A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2244-2251. 1996.
- 27) Op den Camp, H. J. M., A. Oosterhof and J. H. Veerkamp, Interaction of bifidobacterial lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, **47**: 332-334. 1985.
- 28) Takahashi, N., T. Saito, S. Ohwada, H. Ota, H. Hashida and T. Itoh, A new screening method for the selection of *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria with high adhesion to human colonic mucosa. *Biosci. Biotech. Biochem.*,

- 60: 1434-1438. 1996.
- 29) Elo, S., M. Saxelin and S. Salminen. Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2. *Lett. Appl. Microbiol.*, **13**: 154-156. 1991.
- 30) Lee, Y. K., C. Y. Lim, W. L. Teng, A. C. Ouwehand, E. M. Tuomola and S. Salminen, Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 3692-3697. 2000.
- 31) Coconnier, M.-H., T. R. Klaenhammer, S. Kerneis, M.-F. Bernet and A. L. Servin, Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environm. Microbiol.*, **58**: 2034-2039. 1992.
- 32) Kleeman, E. G. and T. R. Klaenhammer, Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal cells. *J. Dairy Sci.*, **65**: 2063-2069. 1982.
- 33) Sarem, F., L. O. Sarem-Damerdjji and J. P. Nicolas, Comparison of the adherence of three *Lactobacillus* strains to Caco-2 and Int-407 human intestinal cell lines. *Lett. Appl. Microbiol.*, **22**: 439-442. 1996.
- 34) Yamamoto, K., T. Miwa, H. Taniguti, T. Nagano, K. Shimamura, T. Tanaka and H. Kumagai, Binding specificity of *Lactobacillus* to glycolipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **228**: 148-152. 1996.
- 35) Kabir, A. M., Y. Aiba, A. Takagi, S. Kamiya, T. Miwa and Y. Koga, Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut*, **41**: 49-55. 1997.
- 36) Mukai, T., Kaneko S. and H. Otori. Haemagglutination and glycolipid-binding activities of *Lactobacillus reuteri*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **27**: 130-134. 1998.

- 37) Conway, P. L. and S. Kjelleberg, Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. *J. Gen. Microbiol.*, **135**: 1175-1186. 1989.
- 38) Chauviere, G., M.-H Coconnier, S. Kerneis, J. Fourniat and A. L. Servin, Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 1689-1696. 1992.
- 39) Henriksson, A. and P. L. Conway, Adhesion to porcine squamous epithelium of saccharide and protein moieties of *Lactobacillus fermentum* strain 104-S. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 2657-2661. 1992.
- 40) Yamada, M., T. Saito, T. Toba, H. Kitazawa, J. Uemura and T. Itoh, Hemagglutination activity of *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**: 910-915. 1994.
- 41) Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser and A. L. Servin, *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, **35**: 483-489. 1994.
- 42) Rojas, M. and P. L. Conway, Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**: 474-80. 1996.
- 43) Matsumura, A., T. Saito, M. Arakuni, H. Kitazawa, Y. Kawai and T. Itoh, New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **82**: 2525-2529. 1999.
- 44) Neeser, J. R., D. Granato, M. Rouvet, A. Servin, S. Teneberg and K. A. Karlsson, *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology.*, **10**: 1193-1199. 2000.
- 45) 斎藤忠夫・大和田修一・伊藤敏敏, 簡便なヒト腸管定住性乳酸菌の新規スクリーニング法—ラット大腸ムチン結合ビーズとヒト大腸カルノア固定

- 切片を利用一，化学と生物，**35**:12-15. 1997.
- 46) Yamamoto, N., T. Shinoda and T. Takano. Molecular cloning and sequence analysis of a gene encoding an Extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**: 1217-1222. 2000.
- 47) 藤田泰仁, 乳酸菌の科学と技術. 蛋白質分解システムの項執筆. 乳酸菌研究集談会編. 第1版. 191-197. 学会出版センター. 東京. 1996.
- 48) 山本憲二, 糖鎖を介した乳酸菌の細胞接着—善玉をとどめて悪玉を追い出す—, 化学と生物, **35**: 12-15. 1997.
- 49) Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**: 103-119. 1985.
- 50) Reha-Krantz, L. J., The *Escherichia coli* strain JM105 contains partial supE activity. *Gene*, **38**: 275-276. 1985.
- 51) Tawari, R., T. Ikeda, R. Malaviya, J. I. Macgregor, J. R. Little, S. J. Hultgren, and S. N. Abraham, The PapG tip adhesin of P fimbriae protects *Escherichia coli* from neutrophil bactericidal activity. *Infect. Immun.*, **62**: 5296-5304. 1994.
- 52) Yamamoto, N. and T. Takano, Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus helveticus* CP53. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**: 2069-2070. 1996.
- 53) Orndorff, P. E. and S. Falkow, Identification and characterization of a gene product that regulates type 1 piliation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **160**: 61-66. 1984.
- 54) Anagnostopoulos, C. and J. J. Spizizen, Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **81**: 741-746. 1961.
- 55) Ikawa, S., T. Shibata, K. Matsumoto, T. Iijima, H. Saito, and T. Ando, Chromosomal loci of genes controlling site-specific restriction endonucleases of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, **183**: 1-6. 1981.

- 56) Sadaie, Y. and T. Kada, Formation of competent *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.*, **153**: 813-821. 1983.
- 57) Ishiwa, H. and N. Tsuchida, New shuttle vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. I. Construction and characterization of plasmid pHY460 with twelve unique cloning sites. *Gene*, **32**: 129-134. 1984.
- 58) Ishiwa, H. and H. Shibahara, New shuttle vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. II. Plasmid pHY300PLK, a multipurpose cloning vector with a polylinker, derived from pHY460. *Jpn. J. Genet.*, **60**: 235-243. 1985.
- 59) バイオ総合カタログ A1-A85. 宝酒造株式会社. 2001.
- 60) 佐々木隆, 乳酸菌の科学と技術. 形質転換の項執筆. 乳酸菌研究集談会編. 第1版. 171-177. 学会出版センター. 東京. 1996.
- 61) 田中良和, 新生物化学実験のてびき 3. 組換え DNA を発現させる実験の項執筆. 下西康嗣・永井克也・長谷俊治・本田武司編. 第1版. 103-130. 化学同人. 京都. 1996.
- 62) Minipreps of Plasmid DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*. (Frederick M. Ausbel and others. eds.) 1.6.1.-1.6.10. *Current Protocols*. New York. 1994.
- 63) 中山広樹, バイオ実験イラストレイテッド 3. 本当にふえる PCR. 第1版. 61-84. 秀潤社. 東京. 1996.
- 64) Thankavel, K., B. Madison, T. Ikeda, R. Malaviya, A. H. Shah, P. M. Arumugam and S. N. Abraham, Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J. Clin. Invest.*, **100**: 1123-1136. 1997.
- 65) 西方敬人, バイオ実験イラストレイテッド 5. タンパクなんてこわくない. 第1版. 127-163. 秀潤社. 東京. 1997.

- 66) Greene, J. D. and T. R. Klaenhammer, Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 4487-4494. 1994.
- 67) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**: 680-685. 1970.
- 68) Yamashita, K., T. Ohkura, Y. Tachibana, S. Takasaki and A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, **259**: 10834-10840. 1984.
- 69) 遠藤玉夫, 糖鎖工学. 糖鎖の機能の項執筆. 糖鎖工学編集委員会編. 第1刷. 85-98. 産業調査会バイオテクノロジー情報センター. 東京. 1992.
- 70) Pierce, M. and J. Arango, Rous sarcoma virus-transformed baby hamster kidney cells express higher levels of asparagine-linked tri- and tetraantennary glycopeptides containing [GlcNAc-beta (1,6)Man-alpha (1,6)Man] and poly-N-acetyllactosamine sequences than baby hamster kidney cells. *J. Biol. Chem.*, **261**: 10772-10777. 1986.
- 71) Dennis, J. W. and S. Laferte, Oncodevelopmental expression of--GlcNAc beta 1-6Man alpha 1-6Man beta 1--branched asparagine-linked oligosaccharides in murine tissues and human breast carcinomas. *Cancer Res.*, **49**: 945-950. 1989.
- 72) Hiraizumi, S., S. Takasaki, K. Shiroki, N. Kochibe and A. Kobata, Transfection with fragments of the adenovirus 12 gene induces tumorigenicity-associated alteration of N-linked sugar chains in rat cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **289**: 9-19. 1990.
- 73) Karlsson, K-A. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**: 309-350. 1989.
- 74) Coconnier, M.-H., M.-F. Bernet, G. Chauviere and A. L. Servin, Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *J.*

- Diarrhoeal. Dis. Res.*, **11**: 235-242. 1993.
- 75) Coconnier, M.-H., M.-F. Bernet, S. Kerneis, G. Chauviere, J. Fourniat and A. L. Servin, Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol. Lett.*, **110**: 299-306. 1993.
- 76) Hudault, S., V. Lievin, M.-F. Bernet-Camard and A. L. Servin, Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 513-518. 1997.
- 77) Lehto, E. M., and S. J. Salminen, Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **18**: 125-132. 1997.
- 78) 松田敏生, バイオプリザベーション: 乳酸菌による食品微生物制御. 乳酸菌などの抗菌作用の項執筆. 森地敏樹・松田敏生編著. 第1版. 125-135. 幸書房. 東京. 1999.
- 79) Perdigon, G., M. E. de Macias, S. Alvarez, G. Oliver and A. A. de Ruiz Holgado, Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect Immun.*, **53**: 404-410. 1986.
- 80) Sawada, H., M. Furushiro, K. Hirai, M. Motoike, T. Watanabe and T. Yokokura, Purification and characterization of an antihypertensive compound from *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**: 3211-3219. 1990.
- 81) COMPACT BIS 簡易マニュアル. アマシャム ファルマシア バイオテック株式会社. 1-8. 東京. 1999.
- 82) Chan, R.C.Y., G. Reid., R. T. Irbin, A. W. Bruce and J. W. Costerton, Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole

- cells cell wall fragments. *Infect. Immun.*, **47**: 84-89. 1985.
- 83) Malaviya, R., E. A. Ross, J. I. MacGregor, T. Ikeda, J. R. Little, B. A. Jakschik and S. N. Abraham, Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J. Immunol.*, **152**: 1907-1914. 1993.
- 84) Clegg S, S. Hull, R. Hull and J. Pruckler Construction and comparison of recombinant plasmids encoding type 1 fimbriae of members of the family Enterobacteriaceae. *Infect Immun.*, **48**: 275-9. 1985.
- 85) Minion, F. C., S. N. Abraham, E. H. Beachey and J. D. Goguen, The genetic determinant of adhesive function in type 1 fimbriae of *Escherichia coli* is distinct from the gene encoding the fimbrial subunit. *J. Bacteriol.*, **165**: 1033-1036. 1986.
- 86) Ito, Y., Y. Sugita-Konishi, F. Kasuga, M. Iwaki, Y. Hara-Kudo, N. Saito, Y. Noguchi, H. Konuma and S. Kumagai, Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radishsprouts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 1532-1535. 1998.
- 87) 高松哲郎, 組織細胞化学. 共焦点レーザー顕微鏡の原理と応用—生きた細胞を捉える三次元顕微鏡—. 日本組織細胞化学会編. 91-95. 学際企画. 東京. 1998.
- 88) 森地敏樹, 乳酸菌利用技術の発達と今後の展望, 日本乳酸菌学会誌, **9**: 69-81. 1999.
- 89) 森下芳行・金子 勉・鈴木 豊・中村康則・石橋憲雄・横倉輝男・老川忠雄, 乳酸菌・乳酸発酵食品の栄養・生理効果の追求, 第5回乳酸菌研究集談会セミナー報告, 乳酸菌研究集談会誌, **5**: 47-78. 1995.
- 90) Salminen, S., M. A. Deighton, Y. Benno and S. L. Gorbach, Lactic acid bacteria in health and disease, Lactic acid bacteria (Salminen, S., *et al.* eds.) Marcel Dekker, New York. 211-253. 1998.

- 91) 日野明寛, 遺伝子組換え食品の現状, 乳酸菌学会誌, **11**: 88. 2000.
- 92) 三木 朗, 遺伝子組換え食品の安全性及び法的規制, 乳酸菌学会誌, **11**: 89. 2000.
- 93) 佐々木泰子・伊藤善之・佐々木隆, 食品として安全な乳酸菌組換え体の作出法, 乳酸菌学会誌, **11**: 90. 2000.
- 94) 佐々木泰子・竹田麻里子・佐々木隆, 安全な選択マーカーとしてチミジン合成酵素遺伝子 *thyA* を用いるヨーグルト乳酸菌の遺伝子操作系, 乳酸菌学会誌, **11**: 25. 2000.
- 95) Tawari, R., J. I. MacGregor, T. Ikeda, J. R. Little, S. J. Hultgren and S. N. Abraham, Neutrophil activation by nascent FimH subunits of type 1 fimbriae purigied from the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **268**: 3009-3015. 1993.
- 96) 賀来満夫, 感染症. MRSA の項執筆. 一山 智・丸山征郎編. 第1版. 183-191. メディカルレビュー社. 東京. 2000.
- 97) 花木秀明・平松啓一, 感染症. VER の項執筆. 一山 智・丸山征郎編. 第1版. 193-202. メディカルレビュー社. 東京. 2000.
- 98) 本田武司, 感染症, 腸管出血性大腸菌 (O-157:H7) の項執筆. 一山 智・丸山征郎編. 第1版. 203-210. メディカルレビュー社. 東京. 2000.
- 99) 本田武司, 病気と細菌毒素. 化学同人. 81-89. 京都 1994.
- 100) Yeh, K. S., L. S. Hancox and S. Clegg, Construction and characterization of a *fimZ* mutant of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.*, **177**: 6861-6865. 1995.