

氏 名 (本籍)	有 馬 三樹子 (神奈川県)
学 位 の 種 類	博士 (学術)
学 位 記 番 号	甲第11号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	乳酸菌での <i>E. coli</i> 由来の線毛アドヒジュンタンパク質 (Fim H) 遺伝子発現 と融合タンパク質の機能解析
論文審査委員	(主査) 坂 田 亮 一 (副査) 政 岡 俊 夫 押 田 敏 雄 森 田 英 利

## 論 文 内 容 の 要 旨

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 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 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 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 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800bp) 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'-TGCCTGGTCATTCACTAGTAAAACCGCCAA-3', リバースプライマー; 5'-TCGCTGGAATAAGCTTAGCGTTGCGCGTCA-3') でPCR増幅した約680bp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をドメインに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 (菌体破砕液) 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サイトを含有する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。

## 論文審査の結果の要旨

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、アドヒジュンタンパク質は*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、乳酸菌が宿主である哺乳動物など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。また、乳酸菌が病原性細菌の付着を競合阻害することは、宿主の腸管内細菌叢の改善に貢献するものである。そこでFimHをコードした*fimH*遺伝子（Klemm *et al.*, 1987）に注目し、これを乳酸菌において発現できるよう、プラスミドの構築を目指した。

本研究は、宿主細胞表面への乳酸菌の付着性向上に関する研究の一環として着手し、病原性細菌がもつ明確なアドヒジュンタンパク質の宿主細胞表面への付着機構に着目し、組換え乳酸菌での本タンパク質遺伝子を発現させることで、組換え乳酸菌と病原性細菌との付着競合阻害させることを目的とし、実施されたものである。

本論文は、病原性細菌の付着機構と乳酸菌の付着因子に関するこれまでの報告など本実験を着手するに至った背景（緒論）に続き、実験に関する記述の第1章～第3章で構成されている。その内容は、グラム陽性菌でFimHを含む融合タンパク質を産生させる発現プラスミドの構築と、*E. coli*と乳酸菌で産生された融合タンパク質の検出と機能解析を行なった部分に大別される。

第1章では、グラム陰性・グラム陽性菌のどちらでも複製可能でテトラサイクリン（Tc）耐性遺伝子をコードしたシャトルベクターpHY300PLK（Takara）を用いて、*Lactobacillus helveticus* CP790株のプロテイナーゼ（*prtY*）遺伝子（Yamamoto *et al.*, 2000）をサブクロニングした。はじめに*prtY*遺伝子のプロモーター上流のシークエンスを決定し、プロモーターを含みPCR増幅した*prtY*遺伝子をpHY300PLKの*Bam*HI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*1102Iで切断されるドメイン（約800 bp）を除去した後、PCR増幅した約680 bpの*fimH*遺伝子をライゲーションし、pYEFH01を構築した。このpYEFH01をシークエンスしたところ、*prtY*遺伝子のドメインへ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。このことから、*E. coli*および乳酸菌で融合タンパク質遺伝子を発現し得るプラスミドが構築された。

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より解析したところ、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。同じバンドが抗PrtYマウス血清にも反応したことから、目的とするFimHをドメインに含む融合タンパク質が産生されていることが認められた。

この融合タンパク質の機能を解析するために、*E. coli* ORN103（pSH2）のCaco-2細胞への付着阻害試験

を行なったところ、*E. coli* JM105 (pYEFH01) の菌体タンパク質の添加により *E. coli* ORN103 (pSH2) の付着性が有意に阻害された (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 FimH と同じく Caco-2 細胞への付着性を有するので、*E. coli* ORN103 (pSH2) の Caco-2 細胞への付着を競合阻害することが認められた。

第 3 章では、pYEFH01 を用い *L. casei* CP680 を形質転換し、Tc 耐性形質転換体 *L. casei* CP680 (pYEFH01) を得た。この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より抗 FimH マウス血清と抗 PrtY 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。すなわち、乳酸菌においても FimH 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が明らかとなった。

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。

本菌のアドヒゼンタンパク質遺伝子のシークエンスより、*Spe* I および *Bpu*1102 I サイトを含むプライマーを構築し PCR 増幅された遺伝子断片を両制限酵素で消化することで、pYEFH01 に容易に組み込み、この遺伝子の発現が可能となる。他の病原性細菌のアドヒゼンタンパク質も遺伝子レベルで解明されている報告が多数あり、同様に pYEFH01 のドメインに他の細菌のアドヒゼンタンパク質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、組換え乳酸菌によって宿主の細胞表面への病原性細菌の付着を競合阻害し得るものと考えられる。

以上、本研究で、グラム陰性菌 *E. coli* 由来の線毛アドヒゼンタンパク質 (FimH) 遺伝子を発現するシステムを構築し、産生された融合タンパク質の Caco-2 細胞への付着機能を有することについても証明した。さらに構築したプラスミド (pYEFH01) を用いて乳酸菌 (*L. casei*) を形質転換し、その組換え乳酸菌において上記融合タンパク質の産生を確認した。

本研究による成果は、抗生物質を用いなくて病原性細菌の感染防御 (付着性阻害) し得る可能性が高い組換え乳酸菌を作出し、またこの組換え乳酸菌は、宿主となる哺乳動物などの細胞表面への付着性の向上から、プロバイオティクスとして貢献することが示唆されるものである。これらの成果はこの分野における新しい研究方向を示したものと高く評価でき、博士 (学術) の学位を授与するにふさわしい業績と判定した。