

## 乳酸菌における多剤耐性遺伝子 (*lmrA*・*lmrP*) の 検索とクローニング

### *Detection and Cloning of Multidrug Resistance Genes (*lmrA*・*lmrP*) in Several Lactic Acid Bacteria*

鈴木 武人<sup>1</sup>, 森田 英利<sup>1</sup>, 松下 瑠美<sup>1</sup>, 橋爪 克仁<sup>2</sup>, 坂田 亮一<sup>1</sup>, 舘 鄰<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 麻布大学獣医学部, 神奈川県相模原市瀬野辺 1-17-71

<sup>2</sup> 宝酒造(株) 遺伝子解析センター, 滋賀県草津市野路町 2257

Takehito SUZUKI<sup>1</sup>, Hidetoshi MORITA<sup>1</sup>, Rumi MATSUSHITA<sup>1</sup>,  
Katsuhito HASHIZUME<sup>2</sup>, Ryoichi SAKATA<sup>1</sup>, and Chikashi TACHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa, 229-8501, Japan

<sup>2</sup> Gene Analysis Center, Takara Syuzo Inc., 2257 Noji-machi, Kusatsu, Shiga, 525-0055, Japan

**Abstract.** The genes, *lmrA* and *lmrP*, are identified as multidrug resistant genes in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* MG1363, and these genes express LmrA and LmrP which are multidrug transporters (Konings *et al.*, 1994-2000<sup>1-14</sup>). Multidrug transporters are a representative mechanism of multidrug resistance in bacteria and mammals. The amino acid sequence of LmrA showed 30% homology to the N- and C-terminal halves of the human multidrug resistant P-glycoprotein MDR1. And especially the sequence identities of ATP binding cassette domain of these protein are high (48% and 43% identical, respectively). In this study, attempts were made to confirm the presence of multidrug resistant genes in *Lactococcus* and *Lactobacillus*, which are lactic acid bacteria. The complete genomic DNA sequences of both *lmrA* and *lmrP* were isolated from 10 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* by PCR amplification, whereas the presence of the homologous genomic DNA sequences genes was not confirmed in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus*. Vector pCAGGS (Niwa *et al.*, 1991<sup>15</sup>) was used as the expression vector for *lmrA* in mammalian cells in this study. The PCR products of *lmrA* was cloned into pCAGGS in *Xho*I site, and pCAGGS-*lmrA* (7,873 bp) was constructed.

**Key words:** multidrug resistance genes, LmrA and LmrP, lactic acid bacteria, expression vector

### 緒 言

細菌のもつ薬剤耐性には、自然耐性と後天的な獲得耐性が挙げられる。後者は突然変異や他の薬剤によって従来、抑制されていた遺伝子の活性化(誘導耐性)、すなわち自らの遺伝子の変異で生じるものと、他の細菌からその耐性遺伝子を受け取る場合がある。獲得耐性が示す薬剤耐性機構として、抗菌薬の不活

化、抗菌薬の外膜透過性の低下、抗菌薬の作用点の変化、細胞内に侵入した抗菌薬の排出などが現在までに明らかにされている<sup>16)</sup>。細菌は生きるためにさまざまな薬剤耐性機構をもち、これらの耐性機構のいくつかを重複してもつことでより高い耐性能を示す。また、現在では複数の抗菌薬に対して耐性を示す多剤耐性能が知られている。

癌治療においても腫瘍細胞の薬剤耐性獲得が問題

となっており、細胞レベルでの抗癌剤耐性の機構についてはさまざまな耐性機構の存在が明らかにされてきた。構造的に関連性のない複数の抗癌剤に対する多剤耐性は腫瘍細胞でもみられ、関与する因子として ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター・スーパーファミリーに属する P-糖タンパク質, multidrug resistance protein (MRP) や, lung resistance-related protein (LRP), トポイソメラーゼ II が知られている<sup>17)</sup>。ABC トランスポーター・スーパーファミリーは、既知の輸送タンパク質ファミリー中で最大かつ最も多様で、いずれも高度に保存された ATP 結合カセットを含んでいる。ABC トランスポーターは現在のところ 50 種類以上発見されており、おのおのが特定の基質、あるいは基質群の輸送に関わっている。このスーパーファミリーが輸送する基質の種類は多様性をきわめており、アミノ酸、糖、無機イオン、多糖、ペプチド、タンパク質にまで及んでいる<sup>18)</sup>。細胞の多剤耐性化現象の多くは P-糖タンパク質の発現によることが明らかになってきており、ヒト P-糖タンパク質の構造遺伝子 MDR1 は 1986 年にクローニングされた<sup>19)</sup>。遺伝子の解析により、ヒト P-糖タンパク質は 1,280 アミノ酸からなる糖タンパク質で、N 末端側半分の 637 アミノ酸と C 末端側半分の 643 アミノ酸の配列は 43% の相同性があること、12 の膜を貫く部位と 2 つの ATP 結合部位を有していること、糖鎖結合部位の存在などが明らかにされている。薬剤結合部位は 5, 6 膜貫通部位と 11, 12 膜貫通部位およびその周辺にある<sup>20)</sup>。

薬剤耐性機構は病原性細菌だけでなく腫瘍細胞に至るさまざまなメカニズムが存在し、薬剤治療や殺菌・消毒を妨げることから医療の現場で問題となっている。特に ABC トランスポーターは、1 つのシステムで広範な薬剤を細胞外へ排出するため、それらのメカニズムの解明により耐性を阻止することは臨床的にも非常に重要であり、多くの研究がなされている。

細菌の薬剤耐性機構という点、これまで病原性細菌に注目が集まってきた。しかし、これら薬剤耐性機構は病原性細菌に限ったものではなく、発酵食品や生菌剤に有用菌として広く利用されている乳酸菌にも多剤耐性機構が存在することが Konings *et al.*<sup>1)</sup>によって明らかにされたのは興味深い。

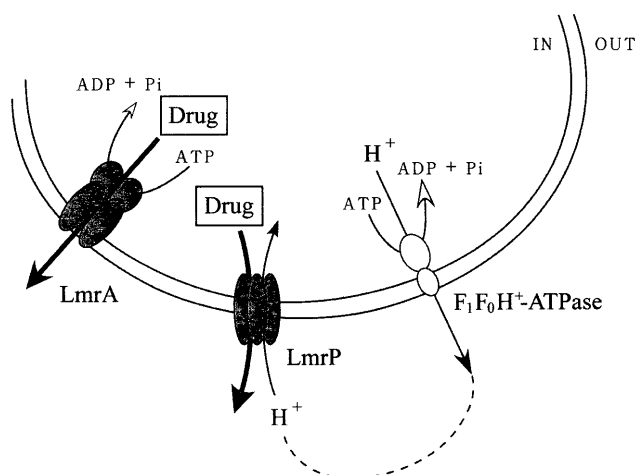


Fig. 1. Schematic presentation of the multidrug transporters LmrA and LmrP in *Lactococcus lactis*<sup>12)</sup>

乳酸菌の一種である *L. lactis* MG1363 は哺乳類の多剤輸送体である P-糖タンパク質の典型的な基質に対する抵抗性を有し、その阻害剤であるレセルピンによって抵抗性が低減することが示された<sup>1)</sup>。P-糖タンパク質の代表的な基質として抗腫瘍薬のダウノマイシン、アクチノマイシン D、抗菌性ポリペプチドのグラミチジン D、蛍光色素のローダミン 6G などがあるが、これらは構造的、機能的にも関連性をもたないことが特徴である。

Konings *et al.*<sup>5)</sup>の研究で、*L. lactis* の多剤耐性機構を担う輸送体が同定され、そのタンパク質構造とそれをコードする遺伝子に加え、薬剤輸送の詳細なメカニズムも報告された。プロトン駆動力を利用する多剤輸送体は LmrP と名付けられ、プロトンと薬剤の逆輸送を行い、細胞内から薬剤を排出する。LmrP は、細胞膜上に存在する F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> H<sup>+</sup>-ATPase のプロトン細胞外排出により生じる水素イオン濃度勾配により輸送を開始する (Fig. 1)<sup>12)</sup>。LmrP は Fig. 2 に示すような二次構造をもつタンパク質であり<sup>2)</sup>、他の細菌にも同様なメカニズムの多剤輸送体が確認されてきた (Table 1)<sup>6)</sup>。これらのタンパク質は二つの保存された配列モチーフをもち、モチーフ A は LmrP の第 2-3 膜貫通部位間の細胞質側ループに存在する GXXXDRXGR というアミノ酸配列で、輸送体チャネルの開閉に必要な立体構造の変化に関係している。モチーフ B は第 5 膜貫通部位に位置し、薬剤排出機構

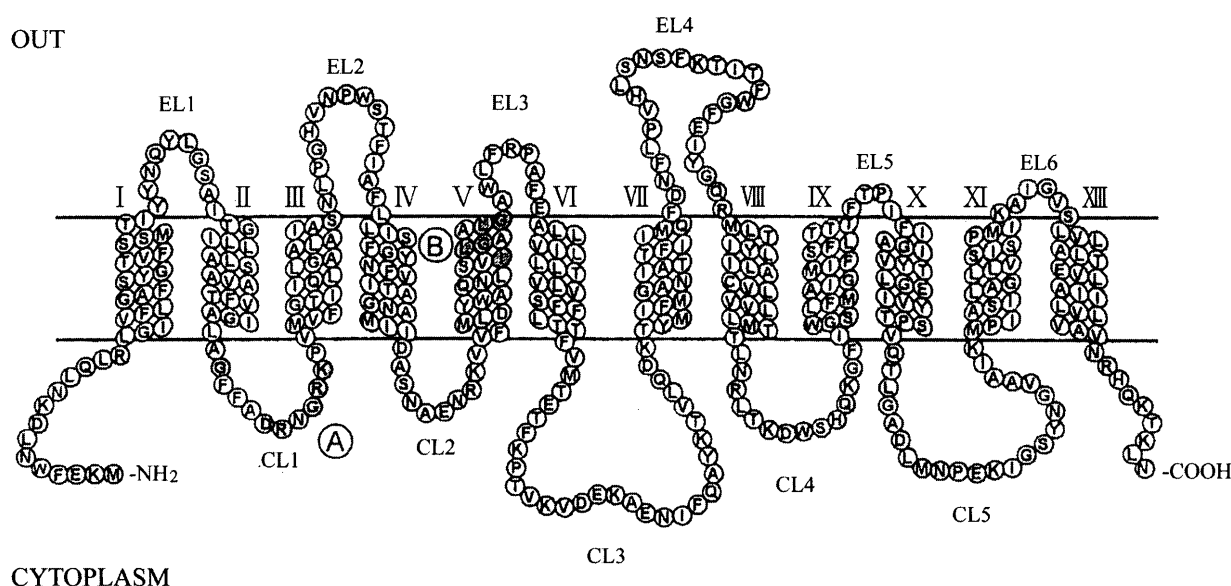


Fig. 2. Secondary structure model of LmrP<sup>2)</sup>

Table 1. Examples of ABC type multidrug transporters in microorganisms and secondary multidrug transporters

Protein	Organism	Reference
ABC type multidrug transporters		
pfMDR1	<i>Plasmodium falciparum</i>	21
ehPgp	<i>Entamoeba histolytica</i>	22
ldMDR1	<i>Leishmania donovani</i>	23
Cdr1p	<i>Candida albicans</i>	24
Pdr5p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Snq2p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
HorA	<i>Lactobacillus brevis</i>	27
Secondary multidrug transporters		
OCT1	rat	28
VMAT1	human	29
caMDR1	<i>Candida albicans</i>	30
QacC	<i>Staphylococcus aureus</i>	31
LfrA	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	32
MtrD	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	33

のみにみられる配列である。LmrP をコードする遺伝子 *lmrP* は 1,227 bp であり、プロモーター配列を含めたシーケンスが GeneBank (Accession No. X89779) に登録されている<sup>2)</sup>。

一方、ATP 依存薬剤排出機構の多剤輸送体は LmrA と名付けられ、LmrA は ATP の加水分解によるエネルギーにより、能動的に薬剤を細胞外へ輸送する (Fig. 1)。LmrA は 1,773 bp の *lmrA* 遺伝子 (Accession

No. U63741) にコードされた 590 アミノ酸からなるタンパク質で、6つの膜貫通部位と N 末端の ATP 結合部位をもっている。これは MDR1 を半分に分けるとそれぞれに類似しており、Fig. 3 に示したようにアミノ酸配列全体の比較で N 末端側 23%、C 末端側 27%、ATP-binding cassette 部位でそれぞれ 48%、43% の相同性が認められている<sup>5)</sup>。両親媒性陽イオン化合物に対する薬剤抵抗性スペクトルや輸送阻害剤が類似していることから、LmrA は MDR1 の半量体とも考えられる。また、LmrA は C 末端側に ABC トランスポーターに特徴的な Walker A および Walker B モチーフを含んでおり、MDR1 と同様に ABC トランスポーターに分類される<sup>6)</sup>。それまでに報告されていた原核生物の ATP 依存薬剤排出機構は、関連性のある薬剤のみという狭い作用スペクトルでしか耐性を発揮せず、MDR のように広範囲に渡る薬剤に抵抗性を示す原核生物の ATP 依存薬剤排出機構としては *L. lactis* MG1363 での報告が初めてであったが、Table 1 の通り、ビール製造中の細菌汚染原因菌の一つである *Lactobacillus brevis* のホップ耐性タンパク質 HorA をはじめ、その他の菌種においても ABC トランスポーターの存在が確認されている<sup>6)</sup>。

本研究では、乳酸菌のもつ *lmrA* および *lmrP* 遺伝子に着目し、いくつかの乳酸菌について PCR 法による *lmrA* と *lmrP* 遺伝子の検索を行い、多剤輸送体遺

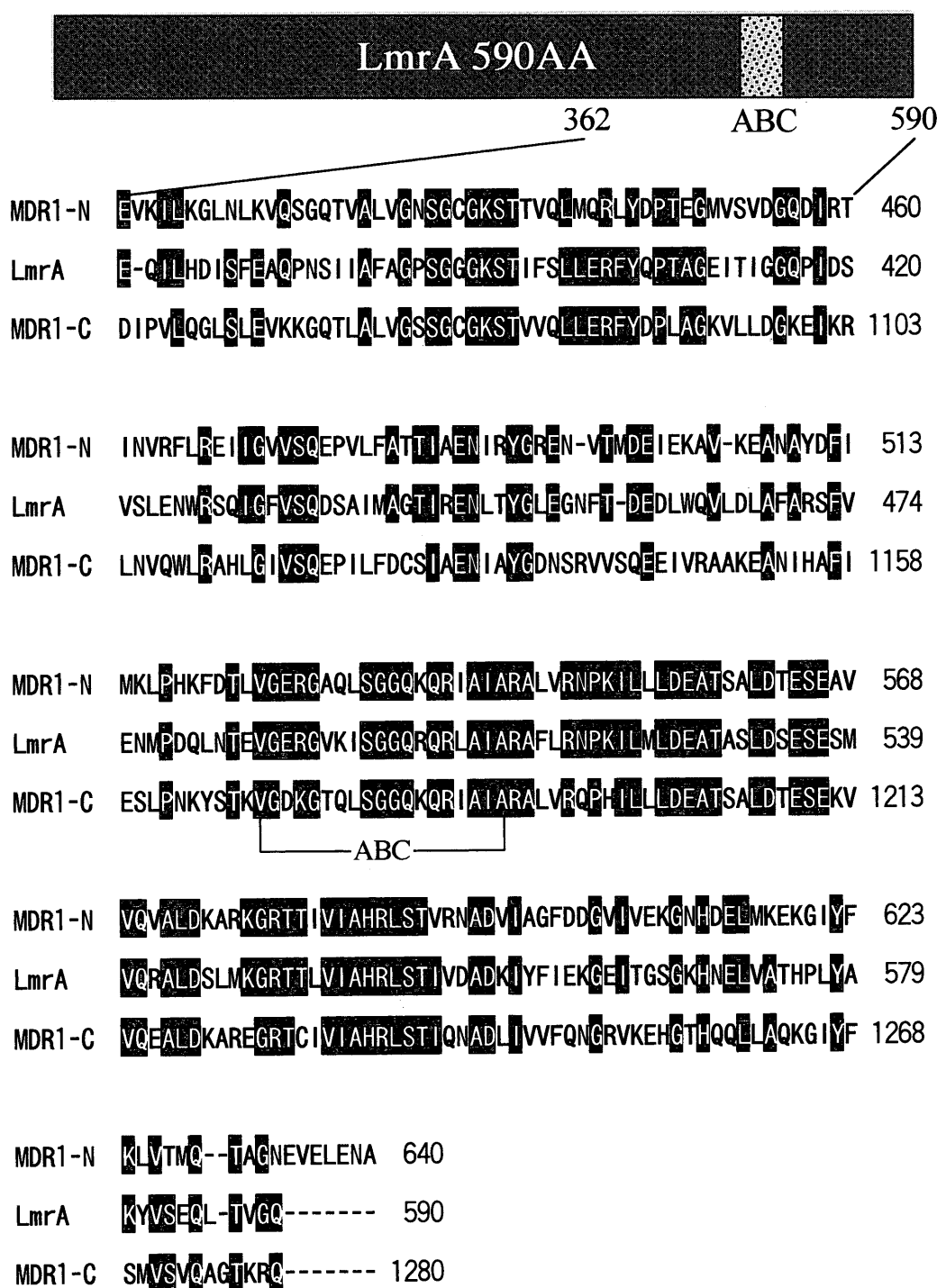


Fig. 3. Comparison of the amino acid sequence of LmrA and the N- and C-terminal halves of the human multidrug resistance P-glycoprotein MDR1<sup>5)</sup>

伝子の存在を検討した。

また、多剤輸送体の積極的利用は非常に興味深い研究分野の一つであることから、細菌由来多剤輸送

体の動物細胞での発現モデル作成の一段階として、*lmrA* 遺伝子を哺乳類細胞で発現可能なベクター pCAGGS-Neo に組み込むことを試みた。

## 材料および方法

### 1. 供試菌株と培養条件

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 9 株 (MG1363, IAM 1066, IAM 12092, ISC 565, ISC 712, NIAI 1061, NIAI SLN, NIRD SC10, LMO 230), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* 2 株 (NIAI DRC1021, NIAI N-7), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2 株 (TUA 439L, TUA 1344L), *Lactobacillus* 属 3 菌種 (*L. fermentum* IFO 3956, *L. sakei* JCM 1157, *L. rhamnosus* ATCC 53103), を用いた。*Lactococcus* 属は TYG 液体培地を用いて 30℃で培養し, *Lactobacillus* 属は MRS 液体培地 (Oxoid 社) を用いて 37℃で培養した。

### 2. 乳酸菌からのゲノム DNA 抽出

ゲノム DNA 抽出には Gen とるくん (TaKaRa 社) を用いた。*L. lactis* MG1363 のみ Marmur の変法により大量抽出を行った。

### 3. PCR 法による *lmrA* および *lmrP* 遺伝子の検索

GeneBank に登録された *L. lactis* MG1363 由来の *lmrA* および *lmrP* 遺伝子のシーケンスをもとに, 発現ベクターへのクローニングを考慮し, 遺伝子の全長を

増幅できるよう Oligo Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc.) により検索し, *lmrA* 検索用として 5'-ATGGAAAGAGGTCCACAAAT-3' および 5'-TTATTGACCAACAGTCAATT-3', *lmrP* 検索用として 5'-TAAAAGAATTTAAGGAATAG-3', 5'-ATTTCTTTTTTTTAGAAGTC-3' のプライマー対を合成した。それぞれのオリゴヌクレオチドは (株) 日本製粉に合成を依頼した。

PCR は各菌株のゲノム DNA をテンプレートに, 一般的なポリメラーゼと比較して DNA 合成の正確さに優れ, 反応至適温度の違いにより非特異的増幅が抑えられる Pyrobest DNA ポリメラーゼ (TaKaRa 社) を用いて行った。それぞれ得られた PCR 産物は DNA シークエンスした。

### 4. 複合プライマーを用いた *lmrA* 遺伝子の検索

*lmrA* 遺伝子の検索については, ヒトの多剤輸送体 MDR1 のアミノ酸レベルでの相同性を踏まえて, 複合プライマーによる *lmrA* 遺伝子の広範な検索も行った。複合プライマーの設定部位は相同性が高く, かつコドンの組み合わせが少なくなるよう乳酸菌のコドン使用頻度に基づいて検討した。これにはケンドールの一致係数<sup>34)</sup>を用い, 有意に使用されているコドンを選択した。

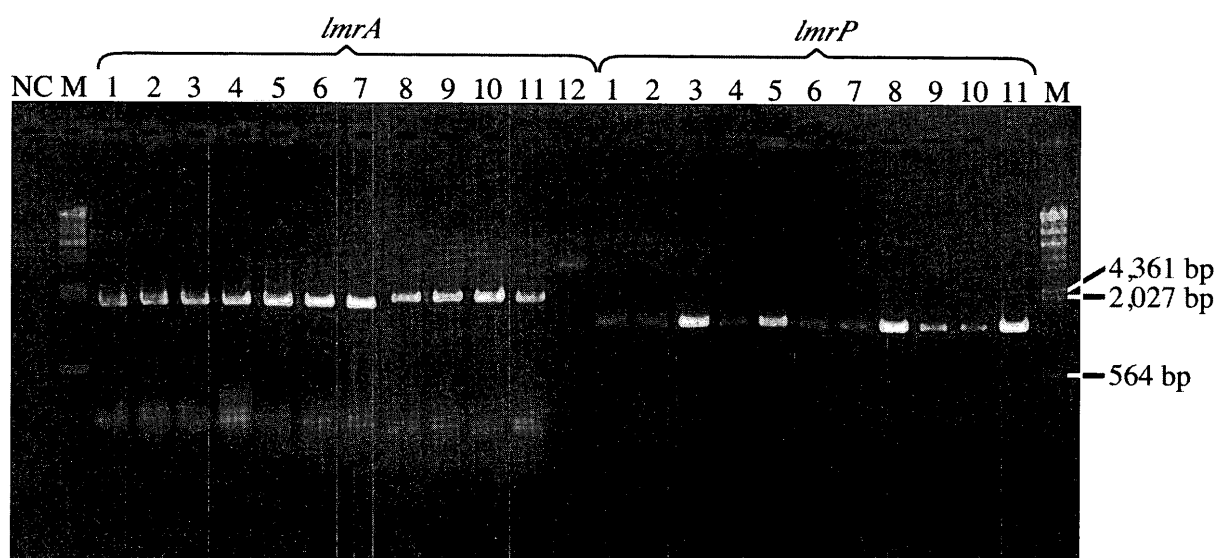


Fig. 4. Electrophoresis of *lmrA* and *lmrP* genes PCR amplification products in *Lactococcus* and *Lactobacillus*. NC: Negative Control, M:  $\lambda$ -Hind III digest (marker of molecular weight), 1: IAM 1066, 2: IAM 12092, 3: ISC 565, 4: ISC 712, 5: NIAI 1061, 6: NIAI SLN, 7: NIRD SC10, 8: LMO 230, 9: NIAI DRC1021, 10: NIAI N-7, 11: MG1363, 12: *Lb.sakei* JCM1157 (The strains displayed this figure was amplified *lmrA* and *lmrP* genes only.)

### 5. *lmrA* 遺伝子のクローニング

哺乳類細胞で発現可能なベクターとして pCAGGS-Neo を用いた。このベクターは大阪大学の宮崎教授より分与された chicken  $\beta$ -actin プロモーターを含む強力な哺乳類細胞発現ベクター pCAGGS<sup>15)</sup>に、喜多村と館がスクリーニングのために pBK-CMV のネオマイシン耐性遺伝子を組み込み、pCAGGS-Neo として構築したものである。

pCAGGS-Neo は *Xho* I により処理後、切断末端の Klenow Fragment (TaKaRa 社) による平滑化および Alkaline Phosphatase による 5'末端の脱リン酸化を行った。Pyrobest DNA ポリメラーゼによる *lmrA* PCR 増幅産物は 5'-末端を T4 Polynucleotide Kinase によりリン酸化した。両者のライゲーションには DNA Ligation Kit Ver.2 (TaKaRa 社) を用いた。構築したプラスミドは *E. coli* JM109 Competent Cell にヒートショック法を用いて形質転換した。Mini Preps 法により形質転換した構築プラスミド DNA を抽出し、制限酵素 *Xba* I 切断後にアガロースゲル電気泳動法を用いて分子量を確認した。同時に構築プラスミドにおいてインサート断片の方向性確認を行った。すなわち、プライマーはクローニングサイトの上流部分と *lmrA* 遺伝子上流部分に範囲を設定し、Oligo Primer Analysis Software により最適な設定部位を検索し、クローニングサイトからベクターの 5' 方向に 975 bp (5'-CGCGTTACT-CCCACAGGTGA-3')、および *lmrA* 遺伝子の先頭から 3' 方向に 210 bp (5'-AAGCAACTTTCGCCATTT-3') の位置にプライマーを設計した。PCR 法には DNA ポリメラーゼに Z-Taq (TaKaRa 社) を用い、増幅産物の分子量をアガロースゲル電気泳動法により確認した。

## 結 果

### 1. PCR 法による *lmrA* および *lmrP* 遺伝子の検索

*L. lactis* MG1363 の *lmrA* および *lmrP* 遺伝子配列をもとに構築したプライマーを用いて各菌種菌株のゲノムをテンプレートに PCR 法を行い、増幅産物をアガロースゲル電気泳動した結果を Fig.4 に示した。*L. lactis* subsp. *lactis* では 11 菌株すべてにおいて *L. lactis* MG1363 と同じ分子量の PCR 産物が確認されたが、同じ属である *L. lactis* subsp. *cremoris* では PCR 産物が得られなかったのは特徴的であった。また、*Lactobacillus*

属においても本研究に用いた菌種菌株では目的の PCR 断片は増幅されなかった。*L. lactis* MG1363 の *lmrA* の上流 (5'領域) の DNA シークエンスは GeneBank に登録されていない。本遺伝子をクローニングする際に必要なシークエンスであるので、本研究でその領域を決定し Fig. 5 に示した。

### 2. PCR 増幅産物の解析

*L. lactis* MG1363 の PCR 産物について DNA 塩基配列を解析したところ、すでに報告されている *lmrA* と一致することを確認した。供試した *L. lactis* のゲノムをテンプレートに *lmrA* 用のプライマーを用いて増幅させた断片を *EcoR* V 処理し、同様に *lmrP* 用のプライマーによる PCR 増幅産物の *Hind* II 処理により、*L. lactis* MG1363 と同様に切断される DNA 断片が得られたことから、それぞれ *lmrA* および *lmrP* であることが確認できた。*L. sakei* については分子量が *lmrA* の約 2 倍の PCR 増幅産物が得られたが、その DNA 塩基配列は *lmrA* とはまったく異なっていた。

### 3. 複合プライマーを用いた *lmrA* 遺伝子の検索

アミノ酸の相同性が高い部分は、指定するコドンの多いアミノ酸が多かったのでコドンの組み合わせを減らす試みを行った。あらゆる生物は遺伝情報を DNA (一部のウイルスは RNA) として保存しており、1 つのアミノ酸を決定しているコドンは複数存在し、L-アルギニンや L-ロイシン、L-セリンでは対応するコドンが最も多い。一方で、タンパク質を構成するアミノ酸はすべてのコドンパターンが一様に使用されているわけではなく、生物種ごとのコドン使用において特異性がある<sup>35)</sup>。そこで、任意に選択した乳酸菌 5 菌種の 6 つのタンパク質について、これらのタンパク質に含まれる L-イソロイシンを指定するコドンの割合を調査したところ、L-イソロイシンを指定する 3 つのコドンのうち atc, ata に対して att が 5 割以上を占めていることが判明した (Table 2)。次に、乳酸菌 4 菌種、計 12 個のタンパク質において、プライマー設計に関わり、指定するコドンが多い L-アルギニン、L-イソロイシン、L-ロイシンの各アミノ酸に対応するコドンの割合を検討し、各タンパク質間におけるコドン割合の相関を順位相関係数であるケンドールの一致係数<sup>34)</sup>により算出した。この結果、

Initiator codon

22 TTAAACGGAGGGGAGAAAGGTAACAAACGAATGAAGAAAAAAGATTAATAACTTTAAGTTCTGATT

*lmrA* gene 1 ——— -1

-48 TTCTTGAATTAAGTTAGTGAATAAGGAATTTAGTCAAAAATAAAAAGTAAGAAGGTTTATTTGAAA

-113 CTCCAAAAGATTGTGTTACGATATTGGTCGACCCAATTCTACTCGCGGTAGCTTTCACCTCAAGAAAG

-178 AAATTTAACGGTAGAAATAGCCTATTCCGGTAGTAAGTGTAGTTATTTCACTTTTACTACAAAACTC

-243 GTTCAAAAAGTTAAACAGCACTACGAAAACTTTAAAAAGTAATGAAGAGCAAAGTTTGTGTCAA

-308 AAAGTAGACTTAGAACAGGTTTTAGTTCGCATAACTAACCATTATCGCGTACTGTATTTGAACAGG

-373 AACGCCATTAAAAAGGGTTAAACACAGTTTTAAAGTAACATCAACGAGTATTTAAGTCGAAGACCC

-438 TGAAAGTTTAGGCTTATGTAAGCAAGGTTATACTATTTTTAAAACTGCCGAGTTCCAATTATTAG

-503 ACTGAGAGGTCTACAAAATTATTTTTACGCCCGCACCTACGCGCTTGACGTGCTAATATTTANANAA

-568 AATTTTTNAACTGGAAAAGGAGAANAATGGTGAAAANTNATCCTTTANAAAGGTANTCNNTNCTCNG

-633 TTGNTTANTTCANACTGGNAAANANCCACNGTCTAAAAGAAACNNATAACCCNTTCCTCAANAAAAC

-698 CTTTNNANANNANACCNNCCNANACGNNTNCGGAANNCNNAN

Fig. 5. Sequence of 5'-region of *lmrA* gene in *L. lactis* MG1363. This sequence of about 700 bp is upper portion of *lmrA* gene was registered in GeneBank.

Table 2. Codon usages in various proteins of lactic acid bacteria

Organism and protein	Percentage of each codon was designated isoleucine			Reference
	att	atc	ata	
• <i>L. lactis</i> MG1363				
LmrA	67.3	26.9	5.8	10
LmrP	85.0	7.5	7.5	12
• <i>L. cremoris</i>				
lipase	56.3	18.8	25.0	42
• <i>L. casei</i>				
β N-acetylglucosaminidase	50.0	46.2	3.8	43
• <i>L. sakei</i>				
arginine deiminase	54.5	45.5	0.44	
• <i>L. fermentum</i>				
ATP-binding protein homolog	73.3	6.7	20.0	45

[Forward primer]							
Amino acid sequence	Leu	Leu	Glu	Arg	Phe	Tyr	Gln
Sequence	① YtN	YtN	gaa	cgN	ttY	taY	ca-
	② YtN	YtN	gaa	aga	ttY	taY	ca-
[Reverse primer]							
Amino acid sequence	Ala	Glu	Asp	Leu	Met	Leu	Ile
Sequence	Dgc	ttc	Rtc	NaR	cat	NaR	Rat

※ D : not c, N : any, R : a or g, Y : c or t

Fig. 6. Base sequence of multiple primer in LmrA detection

上記3つのアミノ酸について相関が得られ、コドンごとに使用される塩基に優位性がみられたので、これを基に上位2/3の塩基配列を元に複合プライマーを構築した。複合プライマーのアミノ酸配列および塩基配列をFig. 6に示した。また、グルタミン酸は指定するコドンが gaa, gag の2つと少ないが、今回調査した各菌のタンパク質で明らかに優位に使用されていた gaa のみを用い、forward 側プライマーは L- アルギニンの塩基配列を cgN あるいは aga のどちらかを用いるように分割した。Fig. 6 の上段が MG1363 の塩基配列を含むプライマーとなる。複合プライマーによって増幅する PCR 産物は推定で 363 bp となり、2つの Forward プライマーのうち、MG1363 由来の DNA 塩基配列を含むプライマーを用いた場合のみ、*L. lactis* subsp. *lactis* の各菌株で目的の PCR 増幅産物が確認された。このことから、本複合プライマーが機能していることが認められた。また、もう一方のプライマーを用いた PCR ではどの菌株においても非特異的なバンドばかりが出現し、目的の分子量のバンドは得られなかった。4,000 bp 付近に PCR 増幅産物が得られた *L. sakei* は複合プライマーでは PCR 増幅がみられなかった。結局、アミノ酸レベルの相同性に着目した複合プライマーを用いたにもかかわらず、*L. lactis* subsp. *lactis* 以外の菌株からは目的とする PCR 断片は得られなかった。

#### 4. *lmrA* 遺伝子のクローニング

得られたアンピシリン耐性 (Amp<sup>r</sup>) 形質転換体のうち、150コロニーを無作為に選抜してプラスミドDNAを抽出した。これらのプラスミドDNAを *Xba*I で切断してアガロースゲル電気泳動を行ったところ、Amp<sup>r</sup> 形質転換体の中に目的の分子量のプラスミドを保有するものが得られた (Fig. 7)。これら Amp<sup>r</sup> 形質転換体について、理論上は 1,223 bp の PCR 増幅産物が得られるが、これら Amp<sup>r</sup> 形質転換体において目的の分子量と思われるバンドが確認できた (Fig. 7)。

#### 考 察

*L. lactis* MG1363 由来のプライマーを用いた PCR 法での各種乳酸菌における多剤耐性 (*lmrA*・*lmrP*) 遺伝子検索の結果、乳酸菌の中でも *L. lactis* subsp. *lactis* に分類されるもののみ *lmrA* および *lmrP* 遺伝子の存在が確認された。分類上、同属同種の亜種である *L. lactis* subsp. *cremoris* から *lmrA* および *lmrP* 遺伝子ともまったく検出されなかった。一方、*L. lactis* subsp. *lactis* の生物学的亜種である *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* では、*L. lactis* subsp. *lactis* と分類上 (遺伝上) ほとんど違いがないため、*lmrA* および *lmrP* 遺伝子が検出されている。

乳酸菌の *LmrA* とヒトの *MDR1* は構造的だけでなく機能的に同様な性質を有している。生物種として類縁関係の大きく離れた生物由来のタンパク質にお



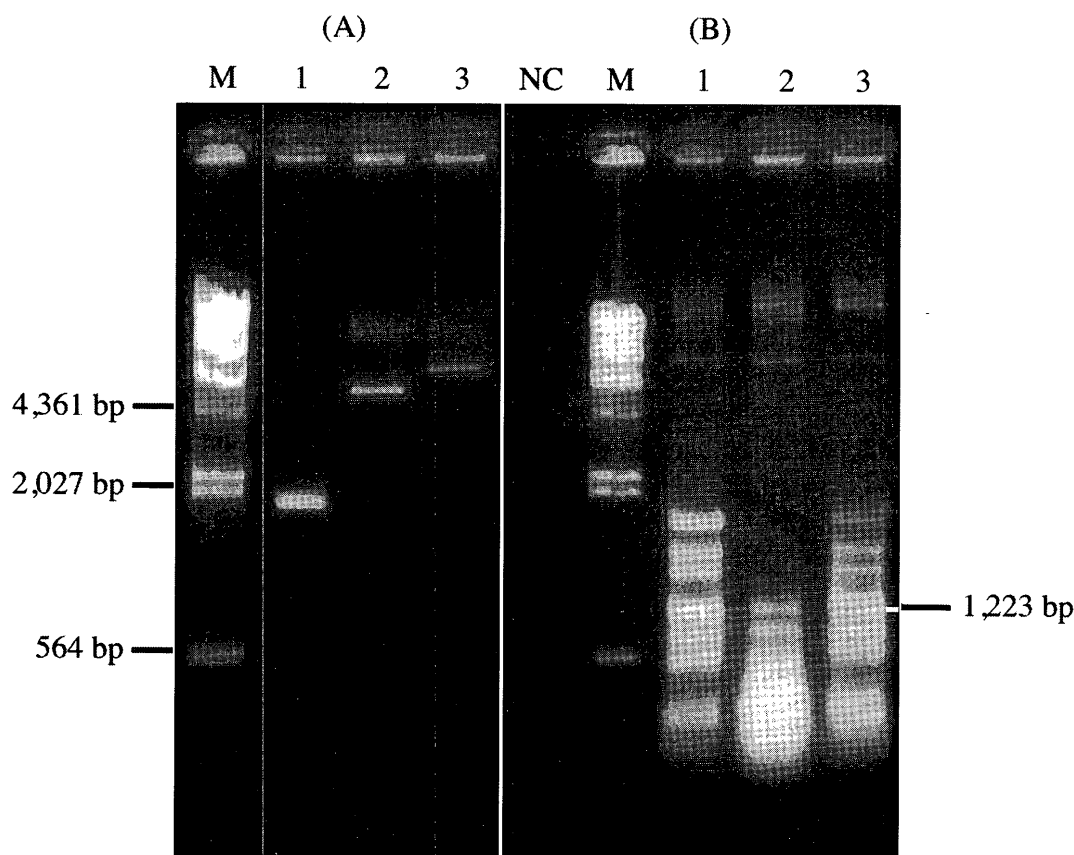


Fig. 7. Cloning of *lmrA* gene into pCAGGS-Neo (A) and Confirmation of insert DNA directionality in pCAGGS-*lmrA* (B). (A). M : $\lambda$ -Hind III digest (marker of molecular weight), 1 : PCR product of *lmrA* (1,773 bp), 2: pCAGGS-Neo (6,092 bp), 3: pCAGGS-*lmrA* (7,873 bp); (B). NC: Negative Control, M : $\lambda$ -Hind III digest (marker of molecular weight), 1 : pCAGGS-*lmrA* ①, 2: pCAGGS-*lmrA* ②, 3: pCAGGS-*lmrA* ③

けるアミノ酸配列の相同性が高い部分をもとに複合プライマーを構築することにより、類似遺伝子の検索を行えるのではないかと推測した。実際、このプライマーで確認された *lmrA* 遺伝子を増幅させることができた。一方、本研究で用いた複合プライマーはPCR法の効率などのために、アミノ酸を指定するコドンの優位性により構築した。本研究結果から、*lmrA*・*lmrP* 遺伝子は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* においては非常によく保存されていると思われる。また、他の乳酸菌ではPCR増幅産物が得られず、*lmrA*・*lmrP* に相同な遺伝子配列をもつ多剤輸送体は存在しないと考えられるが、多剤輸送体タンパク質の機能面からの検索を行っていく必要は残されている。

*lmrA* 遺伝子のクローニングにおいて、Amp<sup>r</sup>形質転換体のプラスミドに目的の分子量と思われるPCR断片が確認できたが、一方で非特異的な増幅産物がみ

られた。これは、Fig. 7のとおり、テンプレートとして用意したプラスミドDNA溶液にゲノムの混入があったために、*E. coli* JM109のゲノム由来の非特異的増幅がみられたものと考えられる。しかし、いずれの形質転換体においても、目的のPCR断片は最も増幅効率が高いことから、pCAGGS-Neoへの*lmrA*遺伝子の導入はできているものと考えられ、pCAGGS-*lmrA*が構築された。Konings *et al.* はLmrAをコードする遺伝子 *lmrA* を哺乳動物細胞発現ベクターにクローニングし、ヒトの胚線維芽細胞で発現させた。LmrAとP-糖タンパク質は機能的に置き換えることが可能であり、この細胞は元の細胞と比較してP-糖タンパク質に特異的な薬剤に対する10～60倍の耐性能の上昇がみられた。これは、細菌のABC型の多剤輸送体がヒト細胞で機能することを証明している<sup>7)</sup>。今後、胚性幹細胞いわゆるES細胞などに本遺伝子を組み込

み、この遺伝子が発現するマウスを作出し、その機能を検討するのは興味を持たれる。

### 結 語

多剤輸送体は、抗生物質や抗癌剤などの薬剤排泄を担うポンプとして発見され、その機能を解明し薬剤輸送を阻害する方向で研究が行われてきた。しかし、近年ではその排泄能を利用して動物体内の有害物質の排泄も検討されている。たとえば環境ホルモンの名で知られる内分泌攪乱物質の一つであるコプラナー PCBs<sup>36)</sup>があるが、コプラナー PCBs を基質とする多剤輸送体の発見は、細胞外のみならず動物個体外へのコプラナー PCBs 排出に応用可能な興味深い分野である。現在、MDR1 によるコプラナー PCBs 排出能は認められていないが、MDR1 のアミノ酸の置換部位により低分子化合物に対する排出が増加するなど化合物に対する耐性に変化がみられる<sup>37)</sup>などの興味深い知見も明らかにされ、今後、内分泌攪乱物質の輸送体の発見は非常に待たれるところである。今後、クローニングされた *ImrA* の機能、哺乳動物細胞での発現などを検討していきたい。

### 引用文献

- 1) Bolhuis, H., Molenaar, D., Poelarends, G., van Veen HW., Poolman, B., Driessen, AJ., and Konings, WN., *J. Bacteriol.* **176**(22), 6957-6964 (1994).
- 2) Bolhuis, H., Poelarends, G., van Veen HW., Poolman, B., Driessen, AJ., and Konings, WN., *J. Bacteriol. Chem.*, **270**(44), 26092-26098 (1995).
- 3) Bolhuis, H., van Veen HW., Molenaar, D., Poolman, B., Driessen, AJ., and Konings, WN., *EMBO J.*, **15**(16), 4239-4245 (1996).
- 4) Bolhuis, H., van Veen HW., Brands, JR., Putman, M., Poolman, B., Driessen, AJ., and Konings, WN., *J. Bacteriol. Chem.*, **271**(39), 24123-24128 (1996).
- 5) van Veen HW., Venema, K., Bolhuis, H., Oussenko, I., Kok, J., Poolman, B., Driessen, AJ., and Konings, WN., *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 10668-10672 (1996).
- 6) van Veen HW., and Konings, WN., *Semin. Cancer Biol.*, **8**, 183-191 (1997).
- 7) van Veen HW., Callaghan, R., Soceneantu, L., Sardini, A., Konings, WN., and Higgins, CF., *Nature*, **39**, 291-295 (1998).
- 8) van Veen HW., Putman, M., Margolles, A., Sakamoto, K., and Konings, WN., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1461**, 201-206 (1999).
- 9) Putman, M., van Veen HW., Poolman, B., and Konings, WN., *Biochemistry*, **38**, 1002-1008 (1999).
- 10) Putman, M., Koole, LA., van Veen HW., and Konings, WN., *Biochemistry*, **38**, 13900-13905 (1999).
- 11) Margolles, A., Putman, M., van Veen HW., and Konings, WN., *Biochemistry*, **38**, 16298-16306 (1999).
- 12) van Veen HW, Margolles, A., Putman, M., Sakamoto, K., and Konings, WN., *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**(1-4), 347-352(1999).
- 13) van Veen HW, Putman, M., Margolles, A., Sakamoto, K., and Konings, WN., *Pharmacology & Therapeutics*, **85**, 245-249 (2000).
- 14) Vigano, C., Margolles, A., van Veen HW, Konings, WN., and Ruyschaert, JM., *J. Bacteriol. Chem.*, **275**(15), 10962-10967 (2000).
- 15) Niwa H., Yamamura K., and Miyazaki J., *Gene*, **108**, 193-200 (1991).
- 16) 一山智・丸山征郎:「感染症」, メディカルレビュー社, (2000).
- 17) 日本臨床腫瘍研究会編:「臨床腫瘍学」, 癌と化学療法社, (1999).
- 18) Bruce, A., Dennis, B., Julian, L., Martin, R., Keith, R., and James, DW., *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*.
- 19) Yusa, K., and Tsuruo, T., *Cancer Res.*, **49**, 5002-5006 (1989).
- 20) Chen, C-J., Chin, JE., Ueda, K., Clark, DP., Pastan, I., Gottesman MM., and Roninson IB., *Cell*, **47**, 381-389 (1986).
- 21) Wilson, CM., Serrano, AE., Wasley, A., Bogenschutz, MP., Shankar, AH., and Wirth, DF., *Science*, **244**, 1184-1186 (1989).
- 22) Descoteaux, S., Ayala, P., Ayala, P., Orozco, E., and Samuelson, J., *Mol. Biochem. Parasitol.*, **54**, 201-212 (1992).
- 23) Henderson, DM., Sifri, CD., Rodgers, M., Wirth, DF., Hendrickson, N., and Ullman, B., *Mol. Cell Biol.*, **12**, 2855-2865 (1992).
- 24) Prasad, R., de Wergifosse, P., Goffeau, A., and Balzi, E., *Curr Genet*, **27**, 320-329 (1995).
- 25) Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., van Dijk, L., and Goffeau, A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 2206-2214 (1994).
- 26) Decottignies, A., Lambert, L., Catty, P., Degand, H.,

- Epping, EA., Moye-Rowley, WS., Balzi, E., and Goffeau, A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 18150-18157 (1995).
- 27) Yasui, T., and Yoda, K., *FEMS Microbiol. Lett.*, **151**, 2169-2176 (1997).
- 28) Grundemann, D., Gorboulev, V., Gambaryan, S., Veyhl, M., and Koepsell, H., *Nature*, **372**, 549-552 (1994).
- 29) Schuldiner, S., Shirvan, A., and Linial, M., *Physiol. Rev.* **75**, 369-392 (1995).
- 30) Ben-Yaacov, R., Knoller, S., Caldwell, GA., Becker, JM., and Klotin, Y., *Antimicrob Agents Chemother*, **38**, 648-652 (1994).
- 31) Littlejohn, TG., Paulsen, IT., Gillespie, MT., Tennent, JM., Midgley, M., and Jones, IG., *FEMS Microbiol. Lett.*, **95**, 259-266 (1992).
- 32) Liu, J., Takiff, HE., and Nikaido, H., *J. Bacteriol.*, **178**, 3791-3795 (1997).
- 33) Hagman, KE., Pan, W., Spratt, BG., Balthazar, JT., Judd, RG., and Shafer, WN., *Microbiol.*, **141**, 611-622 (1995).
- 34) 岩淵千明・浦 光博・石井 滋・西田公昭・神山貴弥：「あなたもできる データの処理と解析」，福村出版，(1997)。
- 35) Brown, TA., MOLECULAR BIOLOGY LABFAX, Bios Scientific Publishers. Limited, Manchester, pp.235-253 (1991).
- 36) 島健太郎：「環境ホルモン・環境汚染懸念物質－現状と産業界の対応－」，シーエムシー，(1999)。
- 37) 藤瀬 浩・池田輝雄・落合秀治・片倉 賢・植田和光：「麻布大学ハイテク・リサーチ・センター研究プロジェクト 中間報告書」，麻布大学ハイテク・リサーチ・センター，(1999)