

Lactobacillus 属乳酸菌での蛍光タンパク発現ベクター系の構築とその応用

Construction of expression vector system and application of the fluorescence protein genes in lactic acid bacteria (lactobacilli)

森田英利, 鈴木武人, 平戸久留実, 加藤行男, 滝沢達也

麻布大学獣医学部

Hidetoshi Morita, Takehito Suzuki, Kurumi Hirato, Yukio Kato, Tatsuya Takizawa

School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. Adherence of lactic acid bacteria (LAB) to intestinal epithelial cells is one of the important characteristics as probiotics. We tried to express the fluorescence protein genes ECFP (cyan fluorescence) or EYFP (yellow fluorescence) in LAB. The fluorescence was used as a marker of LAB adherence to intestinal epithelial cells. A shuttle vector pKT between *E. coli* and LAB was constructed the origin of DNA replication from pMB1 for *E. coli* and pIL253, which is a cloning vector for LAB. pKTCTFP and pKTYFP were introduced fluorescence protein genes ECFP or EYFP from commercial pECTFP or pEYFP, respectively. *L. reuteri* was transformed by pKTCTFP produced cyan fluorescence protein and fluorescence was detected from this bacterium. Furthermore, pH resistant yellow fluorescence protein gene, pKTEYFP-L68V/Q69K, was constructed, and yellow fluorescence was detected from the transformant of *L. reuteri* with this plasmid.

1. 目的

我々は、これまでに腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染モデルラットを用いて、乳酸菌や非病原性大腸菌などのプロバイオティクスによる感染防御を試み、いくつかの菌種において感染を防御する傾向を認めた。その防御機構が病原性細菌に対する付着阻害によるものかどうかを検討するために、結腸腺癌由来培養細胞 HT-29 を用いた *in vitro* による試験を試みた。すなわち、プロバイオティクスの腸管上皮細胞への付着強度の評価および病原性細菌との付着競合阻害を定量的に分析した。従来の抗体や DNA プローブを用いた染色法、RI 標識法では同一菌種異菌株の判別は困難であるが、本研究で試みた蛍光タンパク

質発現ベクター組換え乳酸菌は、菌体内で産生・蓄積された色調の異なる蛍光タンパク質により各菌体細胞が蛍光を発するので、それを蛍光顕微鏡で観察することにより菌株間の違いをも区別できる。

蛍光タンパク質遺伝子はオワンクラゲ由来で、発現を増強した大腸菌用ベクターに連結されたものを入手した。一方、乳酸菌はグラム陽性であり、大腸菌とはプロモーター等遺伝子発現に関わる機構が異なるため、乳酸菌で蛍光タンパク質遺伝子の発現が可能ベクターへ組み換える必要がある。蛍光タンパク質には GFP (green fluorescence protein) の緑色の他に黄色、シアン色、青色、赤色といった色調の異なる蛍光タンパク質遺伝子も開発されている。これらを用いることで、菌種菌株の差異も検出可能と

なることから、培養細胞への付着試験における有用な菌株マーカーとなり得る。また、菌体細胞が発光するために、抗体の感作等の二次的な作業も不必要で、RI 標識法と比較してもより簡便に目的の細菌を判別できる。

2. 材料と方法

<乳酸菌用遺伝子発現ベクターの構築>

乳酸菌における遺伝子発現ベクターは、接合伝達性の薬剤耐性プラスミド pAM β 1 由来の pIL253 をベースに構築した。pIL253 は高コピー数変異型 ori (複製開始点) をもち、異種遺伝子断片を導入しても比

較的安定に保持されることが示されている (1)。乳酸菌からのプラスミド抽出は Anderson and McKay の方法 (2) に従って行った。pIL253 上のエリスロマイシン (Em) 耐性遺伝子プロモーター領域を *Xba* I および *Nco* I, *Bam*HI サイトを付加して PCR 増幅し、マルチクローニングサイト内の *Xba* I/*Bam*HI サイトに組み込むことで乳酸菌用の発現ベクター化した。また、利便性を高めるために *E. coli* の ori (pBR322 由来) を *Nde* I/*Hae* II サイトに組み込み、シャトルベクターとなった pKT を構築した (Fig. 1)。*E. coli* からのプラスミド精製は Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega Corp., Madison, USA) を

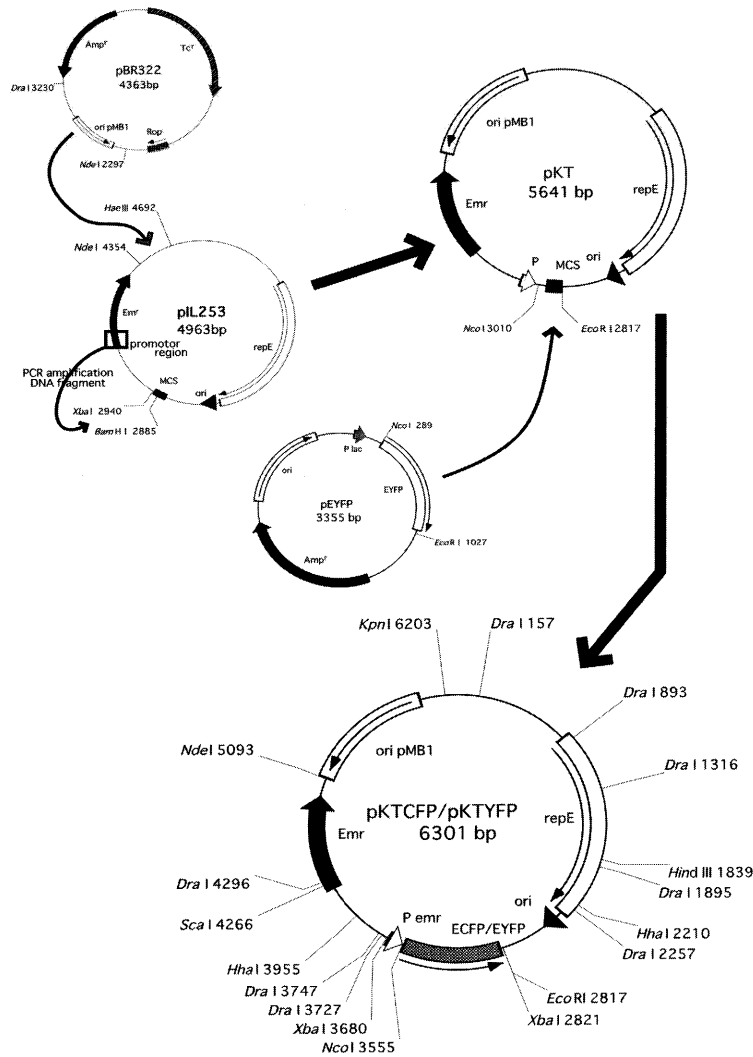


Fig. 1. Construction of pKTCFP/pKTYFP. pKT vector based on pIL253 is expression vector in lactic acid bacteria and is implanted promoter of erythromycin resistance gene and pMB1 ori originate in pBR322. pKTCFP/pKTYFP are constructed pKT and Enhanced cyan and yellow fluorescence protein gene.

用いた。これら遺伝子組み換え操作は Ligation High (東洋紡績, 大阪) を用いて行った。

<蛍光タンパク質遺伝子のクローニング>

蛍光タンパク質遺伝子は wild-type GFP と蛍光波長が異なり, 蛍光強度も増強された大腸菌用ベクターに組み込まれた pECFP, pEYFP (Clontech Lab. Inc., Palo Alto, USA) から制限酵素 *Nco* I および *Eco*R I により切り出した。切り出された ECFP (シアン色の蛍光タンパク質遺伝子) と EYFP (黄色のタンパク質遺伝子) は, 発現ベクター pKT の *Nco* I/*Eco*R I サイトにライゲーションした。それぞれのプラスミドは pKTCFP and pKTYFP とし, これらを用いた乳酸菌の形質転換は Gene Pulser (Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, USA) を用いたエレクトロポレーション法により行った。宿主には *E. coli* JM109 および乳酸菌として *L. reuteri* JCM1112 を使用した。得られた形質転換体からプラスミド抽出を行い, DNA シークエンサー (PRISM3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Inc., Foster City, USA) にて DNA 配列を確認した。

<蛍光観察>

Gene Pulser に供したそれぞれの菌体懸濁液について, *E. coli* JM109 は 500 μ g/ml の Em 含有 LB 寒天培地, *L. reuteri* JCM1112 は 8 μ g/ml の Em 含有 MRS 寒天培地に塗抹し, 37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。得られたコロニーを蛍光退色防止剤 (VECTASHIELD H-1000, Vector Lab. Inc., Burlingame, USA) に懸濁後, スライドガラスに塗抹した。カバーガラスを被せた後に縁を封入剤で固定し, 蛍光顕微鏡 (BX51, オリンパス, 東京) で観察した。ECFP の励起波長は 434 nm, 蛍光波長は 477 nm, EYFP では励起波長 514 nm, 蛍光波長 527 nm となっているので, 前者は WIB フィルター, 後者は WIB および WIG フィルターを用いた。

<蛍光タンパク質産生の確認>

蛍光が観察されなかった形質転換体については, 蛍光タンパク質を SDS-PAGE で確認することを試みた。8 μ g/ml の Em 含有 MRS 液体培地で培養した形質転換体を集菌し, リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し, 1% リゾチーム溶液および 10% SDS 溶液にて溶菌し

SDS-PAGE に供した。蛍光タンパク質のポジティブコントロールには, シアン色の蛍光を発する *E. coli* JM109/pECFP および黄色の蛍光を発する *E. coli* JM109/pYCFP から 10% SDS 溶液で抽出した全菌体タンパク質を用いた。泳動条件は 20 mA, 60 分とした。

3. 結果と考察

<乳酸菌での蛍光タンパク質遺伝子発現ベクターの構築>

Fig. 1 のとおり, pIL253 に乳酸菌で機能するプロモーター (pIL253 の Em 耐性遺伝子由来) とその下流にマルチクローニングサイトを新たに挿入し, さらに *E. coli* 用の *ori* を挿入して発現ベクター pKT (5,641bp) を構築した。pKT による *E. coli* JM109 および pIL253 の宿主として多用される *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMO230 の形質転換を試みたところ, どちらにおいても高頻度で Em 耐性形質転換体を得ることができ, シャトルベクターとして機能することが確認された。pKT のマルチクローニングサイトに蛍光タンパク質遺伝子 ECFP あるいは EYFP を組み込んだプラスミドの全長は共に 6,301bp で, *E. coli* JM109 を形質転換した。Em 耐性形質転換体から抽出したプラスミドの全塩基配列を確認した結果, DNA 配列の変異・欠失などは確認されず, Fig. 1 の下方に示したとおりの蛍光タンパク質遺伝子をもつプラスミド pKTCFP と pKTYFP を構築した。これらのプラスミドによる *L. reuteri* JCM1112 の Em 耐性形質転換体も得ることができた。

<蛍光観察>

pKTCFP と pKTYFP による *E. coli* JM109 のそれぞれの形質転換体は, LB 液体培地および LB 寒天培地のどちらで培養しても, ECFP あるいは EYFP の適切なフィルターを通して菌体からの蛍光を確認できた (Fig. 2)。pKTCFP と pKTYFP による *L. reuteri* JCM1112 の形質転換体において, pKTCFP による形質転換体では MRS 液体培地および MRS 寒天培地どちらの培養形態でも菌体から蛍光が観察されたが, pKTYFP による形質転換体では培養形態に関係なく蛍光はまったく観察されなかった (Fig. 3)。蛍光タンパク質である wild-type GFP や改変 GFP は pH 感受

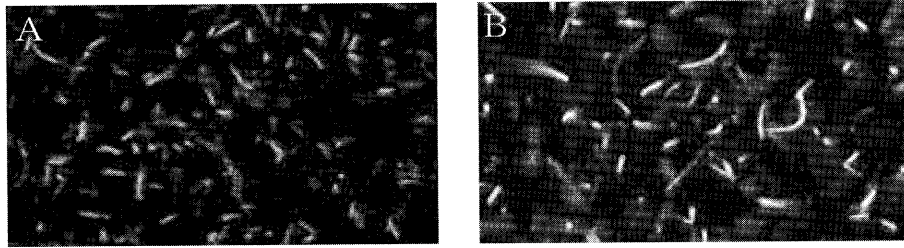


Fig. 2. Fluorescence microscope observation of *E. coli* JM109 transformed with pECFP (A) or pEYFP (B). Photograph A was taken by using WIB filter. Photograph B was taken by using WIB and WIG filters.

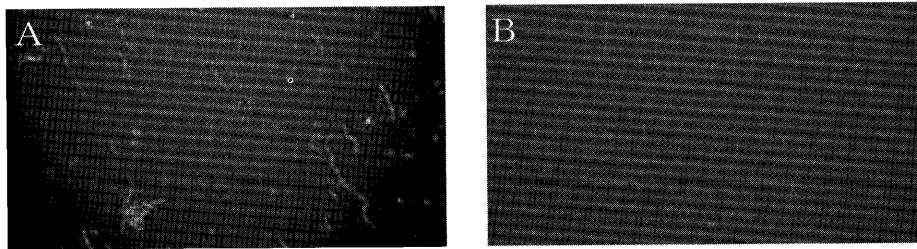


Fig. 3. Fluorescence microscope observation of *L. reuteri* JCM1112 transformed with pKT1CFP (A) or pKT1YFP (B). Photograph A was taken by using WIB filter. Photograph B was taken by using WIB and WIG filters.

性を示す (3)。特に EYFP (黄色の蛍光タンパク質) は pH 感受性が高く、最も蛍光強度が高くなるのが pH9 であるため pH7 付近でさえ蛍光の減弱がみられる。*L. reuteri* などの乳酸菌は培養時に糖源の代謝産物として多量の乳酸を生成するため、培地の pH が容易に低下する。すなわち、pH 感受性の高い EYFP を乳酸菌に対して用いると pH 低下により黄色の蛍光タンパク質の適切なフォールディングがなされず、発色団が形成されなかったと考えられた。

< 蛍光タンパク質産生の確認 >

ECFP と EYFP の蛍光タンパク質の分子量は両者とも約 27 kDa である。シアン色の蛍光を発する *E. coli* JM109/pECFP と黄色の蛍光を発する *E. coli* JM109/pYCFP では宿主である *E. coli* JM109 にはみられない約 27 kDa 付近にバンドが確認された (Fig. 4 の矢印)。このタンパク質は、形質転換体の細胞内で産生された蛍光タンパク質である。シアン色の蛍光が認められた *L. reuteri* JCM1112/pKTYFP では約 27 kDa 付近にバンドが検出された。一方、蛍光が観察されなかった *L. reuteri* JCM1112/pKTYFP から約 27 kDa 付近にバンドが検出されたことから、pKTYFP は発現し YFP の蛍光タンパク質は産生されているものの、pH が低くなることで適切な発色団の

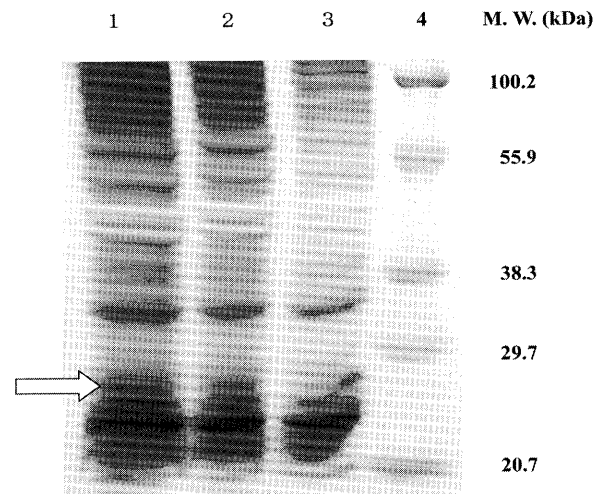


Fig. 4. Silver-stained SDS-PAGE gel of SDS treated whole-cell lysates of *E. coli* JM109 (a host strain) and its transformed with fluorescence protein genes, pECFP and pEYFP. Lane 1, *E. coli* JM109/pECFP. Lane 2, *E. coli* JM109/pEYFP. Lane 3, *E. coli* JM109 (a host strain). Lane 4, marker proteins. Samples of 10 μ l were applied to the 10-20% gradient polyacrylamide gel. Fluorescence protein (ECFP or EYFP) of molecular weight 27 kDa was detected in lanes 1 and 2. Arrow shows 27 kDa protein.

形成が阻害されたものと考えられた。

<pH抵抗性EYFP (pKTEYFP-L68V/Q69K)の構築と黄色蛍光色の確認>

乳酸菌を一般の培地で培養しpH低下を回避することは困難であるが、EYFPの発色団近傍に2つのアミノ酸(L68V/Q69K)を置換することでpH抵抗性を強化し酸性のpH 5以下でも発光が可能となることが報告された(4)。そこで、pKTEYFP-L68V/Q69Kを作製し、そのプラスミドによる*L. reuteri* JCM1112の形質転換体を得て、MRS液体培地での培養を行った後(培地のpHは4.09)、蛍光を観察した。その結果、黄色の蛍光色を認めた。今まで、乳酸菌を蛍光タンパク質で標識する場合にpHの低下による蛍光色の消失が大きな障害となっていたが、それを克服した最初の報告である。

以上、乳酸菌においてもシアン色と黄色の二重発色が可能になったので、今後、乳酸菌単独での培養細胞への付着試験や、病原性細菌と乳酸菌の付着競合阻害の現象を証明していく予定である。

4. 要約

乳酸菌のプロバイオティクス性を示す指標の一つとして腸管上皮細胞への付着性があげられる。乳酸菌に蛍光タンパク質遺伝子を発現させ、産生されたタンパク質の蛍光をマーカーとすることを試みた。まず*E. coli*のプロモーターに連結された蛍光タンパク質遺伝子(pECFP, pEYFP)を乳酸菌で発現させ

るために、pIL253をベースに乳酸菌用プロモーター領域および*E. coli*用oriを組み込んだシャトルベクター-pKTを作成した。次に蛍光タンパク質遺伝子ECFPとEYFPをそれぞれpKTに組み込んだpKTCFPおよびpKTYFPを作成し、*Lactobacillus reuteri*を形質転換した。その結果、pKTCFPによる形質転換体で蛍光タンパク質が産生され、蓄積された蛍光タンパク質により発光する*L. reuteri*の形質転換体を得ることができた。黄色の蛍光タンパク質に関しては、pKTYFPよりpH抵抗性の高いpKTEYFP-L68V/Q69Kを構築し、一般の培養でも黄色の蛍光色を発する*L. reuteri*の形質転換体の獲得に成功した。

5. 謝辞

pKTEYFP-L68V/Q69Kの作製には、麻布大学獣医学部村上賢教授のご協力をいただいた。ここに感謝いたします。

文献

- 1) 伊藤喜之, 乳酸菌研究集談会 編: 乳酸菌の科学と技術, p168, 学会出版センター, 東京, 1996.
- 2) Anderson, D. G. and McKay, L. L. Appl. Environ. Microbiol, 46: 549-52, 1983.
- 3) Miyawaki, A. and Tsien, R. Y. Methods in Enzymology, Chimeric Proteins, 327: 472-500, 2000.
- 4) Miyawaki, A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 2135-2140, 1999.