

増殖因子 IL-3 無添加の条件下では 32D 細胞はすみやかに死滅するのに対して, VH/VL-EPOR(-) あるいは VH/VL-EPOR(G) を発現している 32D 細胞の場合には, 増殖因子 IL-3 無添加の条件下において抗原 HEL の添加の有無, 添加濃度にかかわらず同じ程度の細胞増殖が観察された. これらのキメラ受容体では, 抗体可変領域と EPOR の一部を融合することにより何らかの構造変化が起これり, 32D 細胞の場合には Ba/F3 細胞の場合以上に, 抗原のない条件でもキメラ受容体のホモダイマーあるいはヘテロダイマーが常に生成し, 増殖シグナルを細胞内に伝達している可能性が考えられる. これに対して, VH/VL-EPOR(GSG) を発現している細胞 32D/GSG では, HEL 無添加の場合にはすみやかに細胞が死滅し, HEL を添加した場合には HEL 濃度依存的な増殖と細胞生存率の向上 (アポトーシス抑制) が観察された (Fig. 4). この場合には, 抗原 HEL の添加により初めて VH-EPOR(GSG) と VL-EPOR(GSG) が会合し, 核への増殖シグナル伝達が起こり, その結果, 培地に添加した抗原濃度に依存した細胞増殖の促進が起こったと考えられる.

最近の, EPO と EPOR,⁹⁾ ペプチドアゴニストと EPOR,¹⁰⁾ ペプチドアンタゴニストと EPOR¹¹⁾ の結晶構造解析の結果から, リガンド-レセプター複合体における細胞外ドメインの構造の微妙な相違がシグナル伝達に影響を及ぼすことが示唆されている. 本研究のようなキメラ受容体においても, さらに低い抗原濃度での効率良いシグナル伝達を実現するためには, 細胞外ドメイン構造を最適化する必要があると考えられる.

おわりに

抗体可変領域と受容体とを適当なリンカーで連結した

キメラ受容体を発現する細胞を, 遺伝子工学的に育種した. このような育種細胞では, 高価な増殖因子やサイトカインの代わりに安価な抗原を用いて増殖制御を行うことができるため, このような育種培養細胞を用いた有用タンパク質生産のコストダウンの可能性が期待される.

また, 目的遺伝子と同時にキメラ受容体ペアの遺伝子を細胞に導入すれば, 抗原によって目的遺伝子導入細胞の選択的増幅が可能となり, 遺伝子治療用ベクター導入細胞の選択マーカーとしての応用も可能であろう. 抗原-抗体系は無数に存在するため, 適切な抗原-抗体系を選択すれば, 複数の抗原によって細胞に入力したい複数のシグナルを同時に, あるいは必要な時に必要なシグナルだけを入力することも可能である. このように, キメラ受容体を用いた動物細胞表層工学は, さまざまな応用性を秘めており, 今後の益々の発展が期待される.

本研究は東北大学大学院工学研究科生物工学専攻 熊谷 泉教授, 津本浩平博士との共同研究の成果である. ここに厚く感謝の意を表します.

文 献

- 1) Jixian, D. *et al.*: *Chinese J. Biotechnol.*, **13**, 247 (1998).
- 2) Zang, M. *et al.*: *Bio/Technology*, **13**, 389 (1995).
- 3) Doverskog, M. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **59**, 103 (1997).
- 4) Heldin, C.-H.: *Cell*, **80**, 213 (1995).
- 5) Syed, R. S. *et al.*: *Nature*, **395**, 511 (1998).
- 6) Livnah, O. *et al.*: *Science*, **283**, 987 (1999).
- 7) Ueda, H. *et al.*: *Nature Biotechnol.*, **14**, 1714 (1996).
- 8) Kawahara, M. *et al.*: *Animal Cell Technology: Challenges for the 21st Century* (JAAC/ESACT), Sasaki, S. *et al.* (Eds), p. 255, Kluwer Academic Publishers (1999).
- 9) Watowich, S. S. *et al.*: *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3535 (1994).
- 10) Livnah, O. *et al.*: *Science*, **273**, 464 (1996).
- 11) Livnah, O. *et al.*: *Nature Struct. Biol.*, **5**, 993 (1998).

糖鎖を介した細胞接着に関わる乳酸菌の表層タンパク質

山 本 憲 二

多くの病原性細菌やウイルスは宿主の細胞膜表面に存在する糖タンパク質や糖脂質の「糖鎖」を受容体として細胞に接着し感染することが知られている.^{1,2)}たとえば, ヒトインフルエンザウイルスは宿主の細胞膜上の糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸をレセプターとして認識して細胞に結合し感染する. また, 病原性大腸菌などは繊毛を介して細胞膜上の糖鎖と結合して細胞に感染し, さらに細菌が生産する毒

素 (コレラ毒素など) も細胞膜上の糖脂質の糖鎖をレセプターとして細胞に結合して感染することが知られている. 病原性細菌やウイルスにとって細胞に結合することは宿主細胞に感染する一連の過程の中でもっとも重要なステップである. 微生物が宿主細胞に糖鎖を介して結合することは細胞と細胞の相互認識作用のモデルでもある.

一方, 腸内細菌にとっても腸の蠕動運動やあるいは食

著者紹介 京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻 (教授)

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 TEL. 075-753-6277 FAX. 075-753-6275 E-mail: yamamoto@kais.kyoto-u.ac.jp

べ物の流れに抗して腸内に留まりコロニーを形成するためには腸壁への接着が重要であることは言うまでもない。そこで、私たちは整腸作用や免疫賦活作用などの有益な働きをする腸内の善玉菌と言われている *Lactobacillus* 属乳酸菌が病原性細菌などと同じように宿主の細胞膜表面に存在する「糖鎖」を介して腸管に接着してフローラを形成するものと考えて、*Lactobacillus* 属乳酸菌と糖脂質との結合を調べるとともに、*Lactobacillus* 属乳酸菌の菌体表層に存在すると考えられる糖鎖受容体タンパク質について検討した。さらに *Lactobacillus* 属乳酸菌がプロバイオティクスとして有用であるという観点から、糖鎖受容体タンパク質の遺伝子を菌体に組み込んで菌体表層に発現させ、細胞との接着能を高めたモデル乳酸菌を作成する意図で研究を行った。

1. 糖鎖を介した乳酸菌の細胞接着

乳酸菌と腸壁との接着についてのメカニズムは未だ詳しく解明されていない。そのメカニズムについていくつかの報告があるにもかかわらず、専門書においても、乳酸菌は宿主の腸壁にある粘性物質と付着すると記述されているに過ぎない。³⁾ Conway と Kjelleberg は *Lactobacillus*

属乳酸菌が分泌するタンパク質が菌体と宿主の上皮細胞との結合の橋渡しをしていると報告しており、⁴⁾ Coconnier からも同様のメカニズムを報告している。⁵⁾ また、*Lactobacillus* 属乳酸菌の菌体表層に存在する糖が宿主の腸壁の粘性物質の成分と相互作用するとも言われており、⁶⁾ 最近の研究では *Lactobacillus* 属乳酸菌がマンノースに感受性のある受容体を持っていることが報告されている。^{7,8)} さらに、糖タンパク質であるフィブロネクチン⁹⁾ やコラーゲンとの接着¹⁰⁾ も示されている。

私たちは、先に述べたように宿主の細胞膜上にある糖鎖を介して乳酸菌が細胞接着するのではないかと考えて、*Lactobacillus casei* と糖脂質糖鎖との結合を薄層プレートを用いた免疫染色法¹¹⁾ によって調べた。糖鎖との結合の解析に糖脂質を用いた理由は、糖タンパク質と異なって糖脂質は一分子に一本の糖鎖のみを有しているために、乳酸菌が結合する糖鎖構造の解析が非常に容易となるからである。

まず、スフィンゴ糖脂質を薄層プレートにスポットした後、クロロホルム-メタノール溶液にて展開し、これをポリイソブチルメタアクリレートで処理して固定した。ブロッキングした後、*L. casei* の菌体懸濁液を添加

Table 1. Binding activity of *Lactobacillus casei* to various glycosphingolipids.

| Glycolipid | Structure | Relative binding intensity |
|--------------------|--|----------------------------|
| Glucosylceramide | Glc β 1-1'Cer | 72 |
| Galactosylceramide | Gal β 1-1'Cer | 46 |
| Lactosylceramide | Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 89 |
| CTH | Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 100 |
| Globoside | GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 0 |
| Forssman hapten | GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 0 |
| GM3 | NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 0 |
| GM2 | GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 0 |
| GM1 | Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 0 |
| GD3 | NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 0 |
| GD1a | NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 0 |
| GT1b | NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 0 |
| GQ1b | NeuAc α 2-8NeuAc α 2- ³ Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 0 |
| GA1 | Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 94 |
| LC4 | Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 35 |
| SPG | NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer | 0 |
| Sulfatide | HSO ₃ -3Gal β 1-1'Cer | 27 |

Abbreviations used: Gal, D-galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; Glc, D-glucose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; NeuAc, N-acetylneuraminic acid; Cer, ceramide.

Binding intensity of *L. casei* to CTH was taken as 100.

して4°Cで一晩置き、次いで、*L. casei* 菌体をウサギに免疫して得られた抗乳酸菌ウサギ IgG 抗体を添加した。その後、ペルオキシダーゼで標識したヤギの抗ウサギ IgG 抗体を二次抗体として添加し、免疫染色試薬によって染色した。すなわち、薄層プレートに固定した糖脂質に乳酸菌が結合すると青色に発色することになる。その発色をスキャナーで読み込み、染色の度合いを相対値として計算して糖脂質と菌体との結合性を調べた。Ceramide trihexoside (CTH) に対する結合性を100として、それぞれの糖脂質に対する本菌との結合性を調べた結果を Table 1 に示した。¹²⁾ 本菌は CTH や GA1 に強く結合し、Glucosylceramide や Galactosylceramide, Lactosylceramide などにも結合した。しかし、ガングリオ系の糖脂質など、糖鎖にシアル酸を含む酸性糖脂質にはまったく結合を示さなかった。これらの結果より、本菌は中性糖脂質に対して結合し、非還元末端がガラクトシル基かグルコシル基である糖鎖に結合することが示唆された。また、ガラクトシル基は α -結合でも β -結合でも菌体は結合することが示され、比較的短い糖鎖に結合することも明らかになった。最近、向井らは *L. reuteri* と糖脂質との結合を調べて、私たちの結果と同じように非還元末端がガラクトシル基の糖鎖に本菌が結合することを報告している。¹³⁾

実際に腸管において *Lactobacillus* 属乳酸菌が細胞膜上

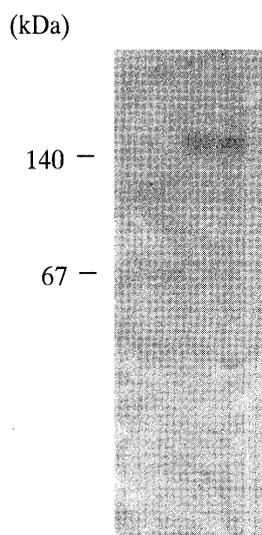


Fig. 1. Immunoblotting of surface layer protein from *Lactobacillus casei* using anti-GA1-monoclonal antibody. The surface layer proteins of *L. casei* obtained by guanidine treatment were incubated with GA1 and the mixture was analyzed by native gradient polyacrylamide gel electrophoresis. Thereafter, the gel was electroblotted onto nitrocellulose membrane and stained by anti-GA1 monoclonal antibody.

の糖鎖に結合していることを明らかにするために、*L. casei* が常在することが知られているラット小腸の粘膜表層を剥ぎ取り、ホモゲナイズした後、クロロホルム-メタノール溶液を用いた Folch 分配とイオン交換カラムクロマトグラフィーによって酸性糖脂質画分と中性糖脂質画分に分離し、それぞれの画分について菌体との結合を調べた。¹²⁾ その結果、酸性糖脂質画分には数種類の糖脂質が存在しているにもかかわらず、薄層プレートを用いた免疫染色法の結果ではまったく本菌の結合が見られなかった。一方、中性糖脂質画分には多くの種類の糖脂質が見いだされたが、Glucosylceramide や CTH, GA1 に相当する糖脂質に菌体との結合が認められた。

2. 菌体表層の糖鎖受容体タンパク質

L. casei の菌体表層に存在すると考えられる糖脂質糖鎖の受容体タンパク質を調べた。*L. casei* 菌体をグアニジン処理して表層タンパク質画分を得て、これに GA1 を添加した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、次いで、抗 GA1 モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、一本の染色バンドが見いだされ、GA1 に結合するタンパク質であることが示唆された (Fig. 1).¹⁴⁾ 本タンパク質は約 16 kDa の分子サイズを持つサブユニットによって構成された約 160 kDa のタンパク質であることが示された。そこで、本タンパク質の遺伝子をクローニングする目的で N-末端より 27 残基のアミノ酸の配列を決定し、これを基にしてオリゴヌクレオチドプローブを作成した。一方、*L. casei* のゲノムライブラリーの構築を企てた。嫌気培養し

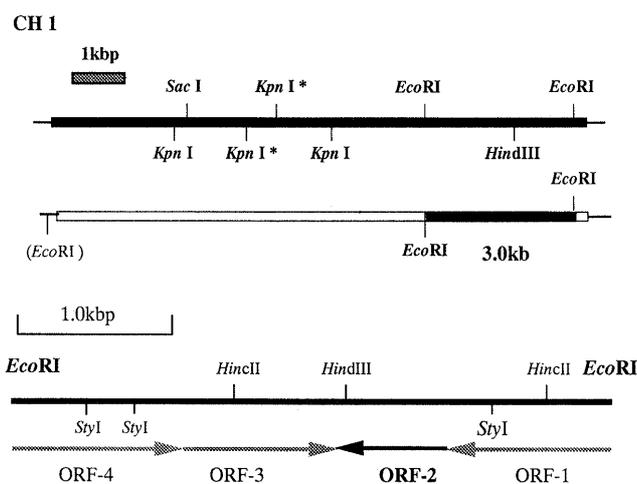


Fig. 2. Restriction map of the insert fragment in positive clone CH1. The 3.0 kbp *EcoRI* fragment was found to be positive by Southern hybridization using the oligonucleotide probe. The fragment contained 4 open reading frames and ORF-2 encoded the GA1-binding protein.

た菌体からゲノム DNA を抽出し、*Sau3AI* で部分分解して、得られた 10-15 kbp の DNA 断片を *Bam*HI でマルチクローニングサイトを切断した Charomid ベクターに繋いだ。これを λ -ファージを介して大腸菌 DH5 α に導入し、得られたゲノムライブラリーより、オリゴヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングした結果、最終的に異なるサイズを持つ 5 つの陽性クローンが得られた。そのうちの一つの陽性クローンを CH1 と名付けて制限酵素地図を作成した。オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズする陽性断片を探したところ、3.0 kb *Eco*RI 断片を見つけ出した。これを pUC18 ベクターでサブクローニングして塩基配列を決定したところ、4 つの Open reading frame を見いだした。このうちの ORF-2 が GA1 の受容体タンパク質の N-末端アミノ酸配列をコードしていたので、求める遺伝子であることが明らかとなった (Fig. 2).¹⁵⁾ ORF-4 は 6-phospho- β -galactosidase とホモロジーが高いことが認められた。ORF-2 がコードする糖鎖受容体タンパク質は 155 アミノ酸残基から構成されているポリペプチドであった。

3. 糖鎖受容体タンパク質の発現

本タンパク質の遺伝子を含む組換えプラスミド pR3E を持つ大腸菌 DH5 α の無細胞抽出液について native gradient ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、*L. casei* の GA1 受容体タンパク質とほぼ同じ分子サイズの位置にタンパク質が強く発現していた。さらに GA1 を添加して電気泳動を行った後、抗 GA1 モノクローナル抗体を用いた Immunoblotting を行ったところ、発現タンパク質に相当する位置に染色が認められた。

本タンパク質が *L. casei* 菌体のどの部分に存在しているかについて調べるために本タンパク質をウサギに免疫して得られた抗血清を用いたウェスタンブロッティングを行った結果、菌体を緩衝液で抽出した画分およびグアニジン処理して得られた画分に本タンパク質が見いだされ、本タンパク質が菌体表面に存在することが示唆され

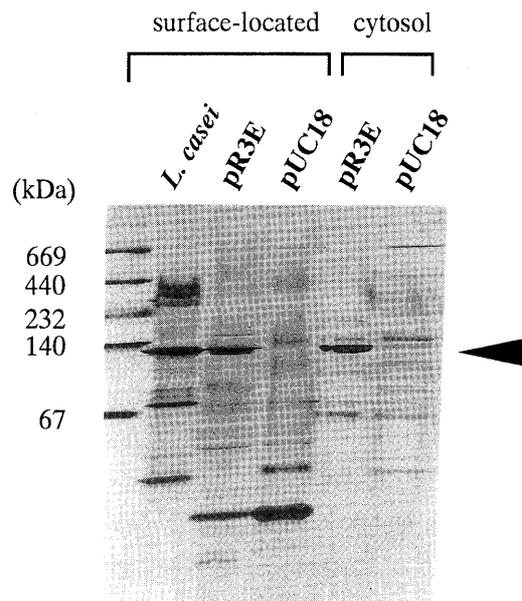


Fig. 3. Native gradient polyacrylamide gel electrophoresis of both fractions of cell surface and cytosol from recombinant *Escherichia coli* and host *E. coli* DH5 α . The protein band was found at the same position as that of GA1-binding protein of *L. casei* in both fractions of recombinant *E. coli*. The arrow indicates GA1-binding proteins.

た。さらにグアニジン処理した後の菌体内の細胞質画分にも本タンパク質が存在することが認められた。すなわち、本タンパク質は *L. casei* 菌体の細胞質と細胞表面のいずれにも存在することが示唆された。また、組み換え大腸菌についても本タンパク質が存在する部分を調べたところ、組換え大腸菌の細胞表面画分にも細胞質画分にも、*L. casei* の糖鎖受容体タンパク質と同じ分子サイズの位置にタンパク質のバンドが見られた (Fig. 3).

4. 糖鎖受容体タンパク質の分布

この糖鎖受容体タンパク質が他の *Lactobacillus* 属乳酸菌にも存在するのかどうかと言うことは大変に興味あることである。そこで、ORF-2 をプローブとして用いて、種々の *Lactobacillus* 属乳酸菌より抽出したゲノム DNA をサザンブロッティング解析した結果、私たちがヒト乳

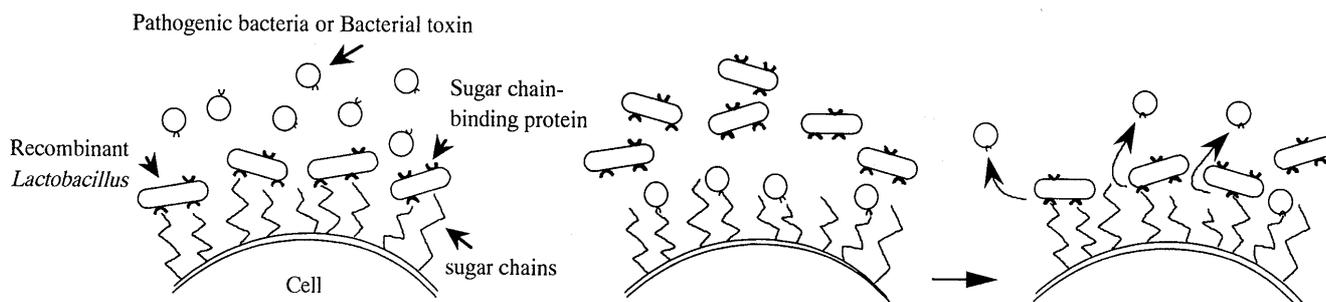


Fig. 4. The concept of lactic acid bacteria therapy using a recombinant *Lactobacillus* strain.

児糞便から単離して *L. plantarum* と同定した菌も含めて、調べたすべての *Lactobacillus* 属乳酸菌のゲノム DNA 上に本タンパク質の遺伝子が存在していることが示された。ところが、この遺伝子を持つ *Lactobacillus* 属乳酸菌の無細胞抽出液について、糖鎖受容体タンパク質の抗体を用いて、ウエスタンブロッティング解析を行った結果、*L. paracasei* および単離同定した *L. plantarum* には糖鎖受容体タンパク質が存在することが示されたにもかかわらず、その他の *Lactobacillus* 属乳酸菌については本タンパク質が発現していないことがわかった。すなわち、本遺伝子を持っている *Lactobacillus* 属乳酸菌のすべてが、その細胞表層に糖鎖受容体タンパク質を発現しているわけではなく、菌株によってその発現が異なることが示唆された。同様にして *Lactobacillus* 属以外の乳酸菌についても本タンパク質の発現を調べたが、いずれの乳酸菌も本タンパク質を発現していない。この結果は本タンパク質が *Lactobacillus* 属乳酸菌の限られた菌株にのみ発現していることが推測された。

5. 展 望

私たちが *Lactobacillus* 属乳酸菌の糖鎖受容体タンパク質の遺伝子をクローニングした目的は、この遺伝子を再び *Lactobacillus* 属乳酸菌に組み込み、糖鎖受容体タンパク質を菌体表層に多量に発現させることによって、細胞との接着能が高められた乳酸菌を得ようとするところである。Fig. 4 は細胞との接着能が高められた組換え乳酸菌を用いた乳酸菌セラピーの概念を示したものである。¹⁵⁾ まず、あらかじめ、組換え乳酸菌を投与することによって病原性細菌や細菌毒素が結合し得る細胞膜上の糖鎖を塞いでおくという方法で、病原性細菌や細菌毒素は結合

し得るけれども乳酸菌は結合できないという糖鎖についても、乳酸菌による立体障害によって病原性細菌や細菌毒素が近づけないようにする。また、病原性細菌や細菌毒素が、いったん細胞膜上の糖鎖に結合しても、結合能が強い組換え乳酸菌を投与することによって、病原性細菌や細菌毒素を排除することができるのではないかと示した。

このような薬剤を用いない乳酸菌セラピーが今後、健康食品志向の中で非常に重要になるものと考えられ、接着能を強化した乳酸菌が必要になるものと考えている。

文 献

- 1) Karlsson, K.-A.: *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 309 (1989).
- 2) 内貴正治: 蛋白質・核酸・酵素, **37**, 1810 (1992).
- 3) Seppo, S. and Wright, A.: In *Lactic Acid Bacteria*, p. 336, Marcel Dekker Inc. (1993).
- 4) Conway, P. L. and Kjelleberg, S.: *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1175 (1989).
- 5) Coconnier, M.-H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2034 (1992).
- 6) Henriksson, A. and Conway, P. L.: *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2657 (1992).
- 7) Adlerberth, I. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2244 (1996).
- 8) Ahrne, S. et al.: *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 88 (1998).
- 9) Slomiany, A. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **286**, 383 (1991).
- 10) Aleljung, P. et al.: *Curr. Microbiol.*, **22**, 33 (1991).
- 11) Provenzano, M. D. et al.: *Anal. Biochem.*, **150**, 76 (1985).
- 12) Yamamoto, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **228**, 148 (1996).
- 13) Mukai, T. et al.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **27**, 130 (1998).
- 14) Yamamoto, K. et al.: *Glycoconj. J.*, **12**, 562 (1995).
- 15) 山本憲二: 化学と生物, **36**, 26 (1998).