

乳酸菌 *Lactobacillus casei* 用タンパク質分泌発現ベクターの開発と応用

宮田 健

〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1 福岡大学薬学部微生物薬品化学教室

Construction and application of a secretory expression vector for *Lactobacillus casei*

Takeshi Miyata

Microbiology Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Fukuoka, 814-0180 Japan.

Abstract: An efficient expression/secretion vector, designated pLPSec, was constructed for extracellular production of heterologous proteins in *Lactobacillus casei* (*L. casei*). To construct pLPSec, a secretory cassette carrying: (1) the LP promoter from lysis gene of lactobacilli phage PL-1, (2) the consensus ribosome-binding site, (3) the signal peptide coding sequence derived from extracellular *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (glcNAcase) of *L. casei* ATCC27092, (4) the transcriptional terminator of glcNAcase gene, was cloned into the pHIL2533 vector, a *L. casei*/*E. coli* shuttle plasmid. The application of pLPSec to effect secretory production of heterologous proteins was demonstrated using two different proteins: the α -amylase encoded by the amyA gene of *Streptococcus bovis* 148 and the green fluorescent protein (GFP) encoded by the gfp gene of *Aequorea victoria*. The α -amylase was secreted with intact enzyme activity in culture supernatant samples of *L. casei* transformants harboring recombinant constructs. The GFP was also secreted in culture supernatant samples, however none of the fluorescent was detected. Therefore, gene-dependent secretion of intact protein was observed. The extracellular expression of the cholera toxin B subunit (CTB) was achieved in *L. casei* ATCC27092 with pLPSec, which may apply to develop a new type oral cholera vaccine using *L. casei* as an antigen delivery vehicle.

Key Words: secretion vector, *Lactobacillus casei*, glucosaminidase, antigen delivery vehicle.

緒言

タンパク質を大量に確保することはタンパク質の構造および機能の決定などの実験レベルだけでなく、医薬品の製造などの工業的レベルにおいても、必要不可欠である。細菌は、タンパク質を大量に発現し、確保するためのツールとして、最も適した生物種の一つである。その中でも特に、*Escherichia coli* は、遺伝学的、生化学的性質の解明が最も進んでおり、タンパク質の大量発現用宿主として用いられている [1]。しかし、その使用においては、いくつかの問題点も指摘されている。その一つは、*E. coli* 菌体内においてタンパク質を大量に発現させると不溶性のタンパク質凝集体の形成が誘導され、その生理的活性が喪失することで

ある。そこで、このタンパク質の不活性化を解決するために、発現したタンパク質を、菌体外へ分泌させるベクターの開発が試みられている。しかし、グラム陰性菌である *E. coli* では、分泌発現ベクターによって発現したタンパク質の菌体外への分泌効率は低く、高いタンパク質産生効率が得られていない [1]。一方、グラム陽性菌である枯草菌などの *Bacillus* 属のいくつかの種は、アミラーゼや プロテアーゼなど工業的に利用価値の高いタンパク質を大量に発現し分泌することができ、タンパク質を分泌発現させるための宿主として利用されている [2、3]。すなわち、*E. coli* と対照的に、タンパク質の分泌発現が容易であることを示唆している。*Bacillus* 属と同じグラム陽性菌である乳酸菌の *Lactobacillus* 属細菌も タンパク質分泌発現についての報告があり [4、5]、タンパク質を分泌発現させるための宿主として乳酸菌は有用であると考えられる。

Lactobacillus 属のなかで、ヒト常在菌の一つである *Lactobacillus casei* は、ヒトに対し高い安全性をもつ有用な微生物として認識され、食品や医薬品の原料として、幅広く利用されている [6、7]。これは、*L. casei* が、発熱物質を生産する *E. coli* や病原性細菌も含まれる *Bacillus* 属と比較して、実験的目的や工業的目的だけでなく、特に安全性が必要な食品や医薬品開発目的の分泌発現ベクターの宿主として利用可能であることを示唆している。また、さらに、*L. casei* は、胃酸や胆汁に対する抵抗性や腸管上皮細胞への付着性を有することから [8]、医薬品への応用に関して他の細菌には見られない付加価値を持っている。したがって、*L. casei* の分泌発現ベクターの開発は、*L. casei* の医薬品としての用途拡大の観点から大変期待されている。近年、*L. casei* を宿主とする分泌発現ベクターについて、pGIT008 による *Bacillus licheniformis* 由来の α -amylase の分泌発現 [4] や pLP400/500 シリーズによる *Clostridium tetanite* 由来の tanus toxin fragment C (TTFC) の分泌発現 [5] などについて、いくつかの報告がなされた。しかし、この 2 つのベクターによるタンパク質の分泌発現では、*L. casei* を宿主とした場合、タンパク質の分泌発現量は他の *Lactobacillus* 属を宿主とした場合と比較して少ない。したがって、*L. casei* を実験レベルや工業レベルにおける大量発現の宿主として利用するために、分泌発現ベクターの分泌発現能をさらに高めることが必要となる。このような状況から、我々は、*L. casei* 用の発現量の高い分泌発現ベクターの構築を試みることにした。

本研究では *L. casei* ATCC27092 (S-1 菌) 株培養液上清中に分泌される *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (glcNAcase) [10] の 32 アミノ酸残基からなる分泌シグナルペプチド配列コード領域 (glcNAcaseSS) を乳酸菌と大腸菌のシャトルベクターである pHIL253 に組込んだ分泌発現ベクター pLPsec を構築して、異種タンパク質の *Streptococcus bovis* 148 株由来の α -amylase と *Aequorea victoria* 由来 green fluorescent protein (GFP) の分泌発現を試みた。また、*Vibrio cholerae* によって産生されるコレラ毒素 (CT) のサブユニットである CTB の遺伝子を pLPsec に導入し、S-1 菌に CTB を分泌発現させ、コレラに対する新しいワクチンへの応用を試みた。

(1) *glcNAcase* 遺伝子上流塩基配列の決定と解析

L. casei ATCC27092 (S-1 菌) 株培養液上清中に分泌される *glcNAcase* [9] の構造中に見いだした 32 アミノ酸残基からなる分泌シグナルペプチド配列 (*glcNAcaseSS*) を利用して分泌発現ベクターを構築するために、*glcNAcase* 遺伝子上流の塩基配列を決定し、遺伝子発現制御領域の解析を行った。



Fig. 1. Nucleotide sequence of the upstream and signal peptide coding region of *glcNAcase* gene.

Amino acids are marked in capital letter. Shine-Dalgarno sequence, -35 and -10 regions sequence are underlined. Signal peptide sequenced are boxed and The cleavage site in the signal peptide is indicated with a vertical arrow.

その結果、Fig. 1 に示すように、上流配列中にはプロモーター配列 (-35 領域、-10 領域)、グルコースにおける遺伝子転写制御配列 (CRE)、リボソーム結合配列 (SD 配列) のコンセンサス配列が存在していた。また、分泌シグナルペプチド配列の詳細な解析を行ったところ、グラム陽性菌における一般的なシグナルペプチド配列構造をとっていることが分かった。さらに CRE によってグルコース存在下における *glcNAcase* 遺伝子の転写抑制が起こることも分かった。すなわち S-1 菌を炭素源としてグルコースの代わりに リボース存在下で培養すると *glcNAcase* 活性はグルコース存在下よりも、約 5 倍高い値を示した。以上のことから、*glcNAcaseSS* コード領域および *glcNAcase* 遺伝子由来プロモーター領域を乳酸菌用ベクターに導入して分泌発現ベクターを構築し、これに目的遺伝子を導入して乳酸菌を形質転換させ、得られた形質転換体をリボース存在下で培養すれば、目的のタンパク質を分泌させる事ができると考えられた。

(2) *glcNAcase* 遺伝子上流配列を利用した分泌発現型ベクターの構築

(1) で決定した上流領域を利用する分泌発現ベクターの構築を行った。まず、枯草菌と大腸菌のシャトルベクターpHY300PLK と乳酸菌のベクターpIL253 より乳酸菌および大腸菌で共に機能するシャトルベクターpHIL253 を構築した。次に、この pHIL253 に *glcNAcase* 遺伝子由来の分泌シグナルペプチドコード領域 (*glcNAcaseSS*) とプロモーター (GP) を含んだ上流領域と *glcNAcase* 遺伝子由来の転写終結配列 (Term) を組み込んだベクターに、HisX6-tag 遺伝子を付加した *glcNAcase* 遺伝子を導入して pHGHIS2 を構築した (Fig. 2)。pHGHIS2 をエレクトロポレーション法で S-1 菌に導入し、形質転換 S-1 菌培養上清中の HisX6-tagged *glcNAcase* 融合タンパク質の分泌発現を抗 HisX6-tag 抗体を用いたウエスタンブロット (WB) 法により確認した (Fig. 3)。その結果、Lane 7 に示すように、HisX6-tagged *glcNAcase* の分泌発現が確認された。

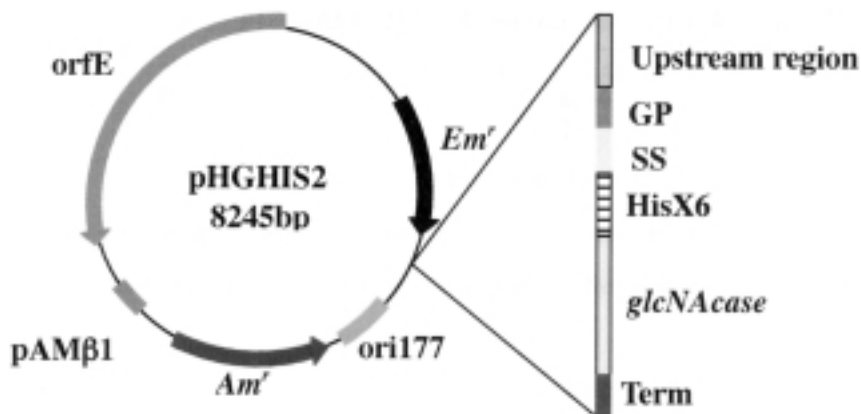


Fig. 2. Schematic representation of HisX6-tagged *glcNAcase* secretion vector pHGHIS2.

Upstream region, *glcNAcase* promoter upstream region; GP, *glcNAcase* promoter; SS, *glcNAcaseSS*;

HisX6, HisX6-tag; *glcNAcase*, *glcNAcase* gene; Term, *glcNAcase* transcription terminator region.

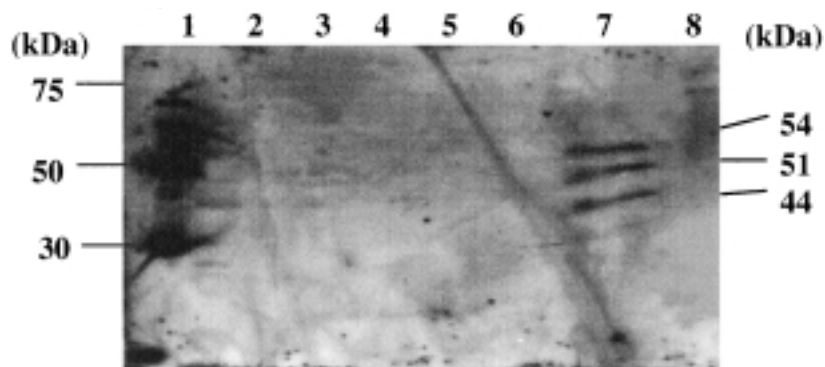


Fig. 3. Western blot analysis of pHGHIS2 harboring S-1.

Lane1, 6 x His Protein ladder Marker; Lane2, S-1 cell lysate; Lane3, S-1[pHGHIS2 No.1 clone] cell lysate; Lane4, S-1[pHGHIS2 No.2 clone] cell lysate; Lane5, S-1 concentrated supernatant; Lane6, S-1[pHGHIS2 No.1 clone] concentrated supernatant; Lane7, S-1[pHGHIS2 No.2 clone] concentrated supernatant; Lane8, SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range Marker.

以上の結果、GP、glcNAcaseSS、Term から成る分泌発現カセットを pHIL253 に組み込んだベクターは、S-1 菌でのタンパク質分泌発現を可能にするという事が分かった。しかし、プロモーターGP には CRE 配列 [10] が存在しており、グルコース存在下では下流遺伝子の発現は抑制を受ける。したがって、今回、pHGHIS2 導入 S-1 菌の培養に炭素源としてグルコースの代わりにリボースを用いた。しかし、リボース存在下ではグルコースの場合に比べて、菌の増殖が遅く、目的の分泌タンパク質の量を得るには長時間の培養が必要であるので、今回構築した分泌発現ベクターはタンパク質の大量生産という観点からは有用であるとは言えない。そこで、改善策として GP に代わる CRE の制御を受けない新規プロモーターが必要であると考えられたので、このプロモーター部位の置換による改良を行った。

(3) 乳酸菌タンパク質分泌発現ベクターの改良

GP に変わる新規プロモーターとして、CRE 配列が存在せず、グルコース存在下においても発現可能な S-1 菌を宿主とするバクテリオファージ PL-1 の溶菌酵素 (lys) の遺伝子のプロモーター [11] (LP; Fig. 4) を用いて、改良型分泌発現ベクター pLPSec を構築した。このベクターに HisX6-tag 遺伝子を付加させた glcNAcase 遺伝子をリポーター遺伝子として導入した pLPSecglcNAcase を、エレクトロポレーション法により S-1 菌に導入して、37°C で 48 時間培養後、培養上清中の HisX6-tagged glcNAcase の発現を WB 法で解析した。

promoter (vector)	consensus sequence			
	<u>-35</u>	<u>CRE</u>	<u>-10</u>	<u>SD</u>
	<u>TTGACA</u>	<u>TGWAANCGNTNWCACA</u>	<u>TATAAT</u>	<u>AGGAGGT</u>
GP: <i>glcNAcase</i> (pHGHIS2)	<u>TGAAAATCATT</u> <u>TTGAAT</u> <u>TGAAAAGCGATTCCAGCATATTC</u> <u>TAACTT</u> ... <u>AAGGAGGTG</u>	<u>CRE</u>	<u>-10</u>	<u>SD</u>
LP: <i>Lys</i> (pLPSec)	<u>GGAATGCTGTCAG</u> <u>GACTTGCATCCGTTGGCGTTTAT</u> <u>CBAATTGTT</u> ... <u>GAGGAGGTAA</u>	<u>-35</u>	<u>-10</u>	<u>SD</u>

Fig. 4. Comparison of promoter sequence on some genes derived from *L. casei* S-1 and PL-1 phage.

The -35, -10 elements and SD sequence are underlined. CRE elements is boxed. CRE; catabolite repression element, W; A or G and N; A or T or G or C. SD; Shine-Dalgarno sequence.

その結果 Fig. 5、Lane 8 に示すように、pLPSecglcNAcase 導入 S-1 菌は、S-1 菌の増殖が最適なグルコース存在下において、HisX6-tagged glcNAcase を分泌発現した。以上、pLPSec は S-1 菌の生育が良いグルコース存在下でタンパク質生産を行うという観点において有効な分泌ベクターであると考えられた。

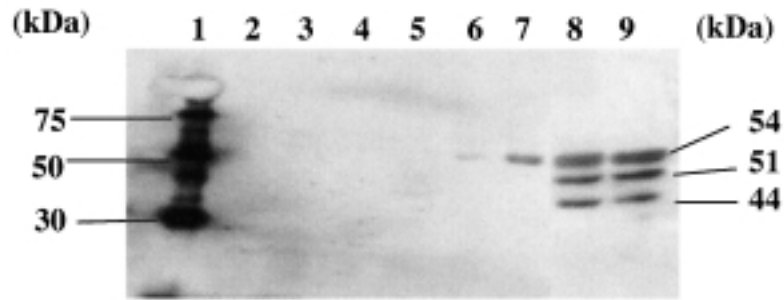


Fig. 5. Western blot analysis of pLPSecglcNAcase harboring S-1.

Lane1, 6 x His Protein ladder Marker; Lane2, Medium containing glucose; Lane3, Medium containing ribose; Lane4, S-1 [glucose] concentrated supernatant; Lane5, S-1 [ribose] concentrated supernatant; Lane6, S-1 [pHGHS2/glucose] concentrated supernatant; Lane7, S-1 [pHGHS2/ribose] concentrated supernatant; Lane8, S-1 [pLPSecglcNAcase/glucose] concentrated supernatant; Lane9, S-1 [pLPSecglcNAcase/ribose] concentrated supernatant.

(4) 乳酸菌タンパク質分泌ベクターを用いた異種遺伝子産物の分泌発現

(3) で構築した pLPSec に異種細胞由来の遺伝子を導入し、その遺伝子産物の分泌発現を検討した。原核生物由来の遺伝子産物として *Streptococcus bovis* 148 株由来の α -amylase と真核生物由来の遺伝子産物として *Aequorea victoria* 由来 green fluorescent protein (GFPuv) [12、13、14] の分泌発現を試みた。pLPSec に α -amylase 遺伝子あるいは GFPuv 遺伝子を導入し、それぞれ pLPSecamy、pLPSecGFPuv を構築し、エレクトロポレーション法により、S-1 菌に導入してそれぞれのタンパク質の分泌発現を確認した。pLPSecamy の場合、得られたエリスロマイシン (Em) 耐性形質転換体を MRS 寒天培地に塗布し、次いで、デンプン入り寒天液を重層し、37°C で 48 時間培養した。培養後の α -amylase の分泌はコロニー周辺のデンプンの分解をヨウ素蒸気の曝露によるコロニー周辺のハローの形成を調べて行った。すなわち、分泌した α -amylase でコロニー周辺のデンプンが分解されていれば、ヨウ素-デンプン反応による紫色が生じないので、ハローとして検出される。その結果、Fig. 6 (A) に示すように、ハロー形成をしている形質転換体を得られたので、これらの形質転換 S-1 菌は α -amylase を分泌していることが示唆された。

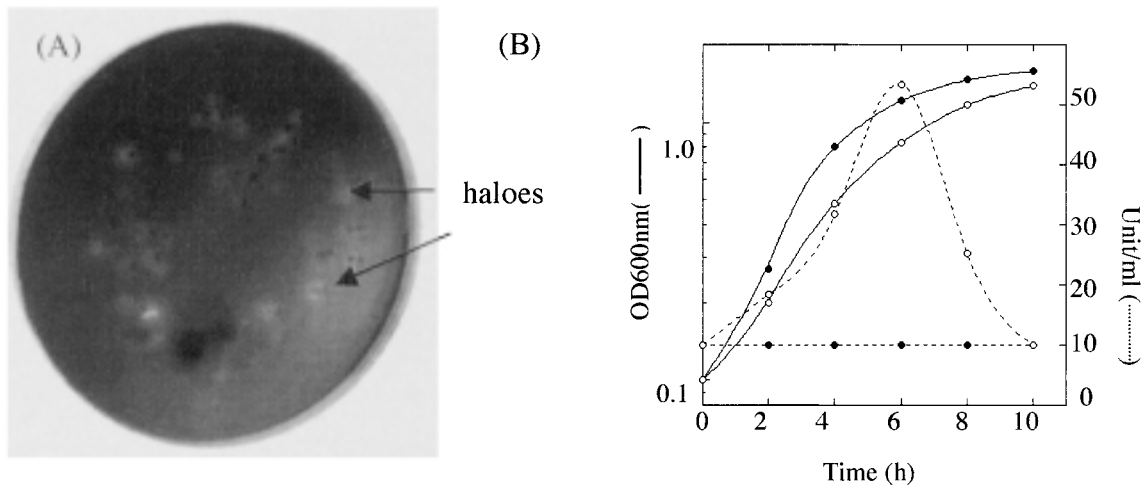


Fig. 6. (A) Detection of α -amylase positive haloes. (B) Activity of α -amylase from supernatant of S-1 in time course. Symbols: ●; S-1, ○; pLPSecamy/S-1

そこで実際に培養上清中に α -amylase が分泌しているかを培養上清の α -amylase 活性を Bernfeld ら [15] の方法で測定して確認した。その結果、Fig. 6 (B) に示すように、培養上清中の α -amylase 活性は培養時間と共に徐々に増大し、対数増殖後期 (約 6 時間後) において、その活性はピークを示した。しかし、定常期後は、 α -amylase 活性は急速に減少して、培養 10 時間目では活性は完全に消失した。この事から pLPSec に導入した α -amylase は S-1 菌培養上清に生理活性を有したまま分泌しているが、長時間は安定ではないことが分かった。これは乳酸菌の培養上清に存在するプロテアーゼ [16] によって α -amylase が分解されたためと考えられた。以上、乳酸菌用タンパク質分泌発現ベクター pLPSec を用いて、原核生物由来異種タンパク質として α -amylase の分泌発現に成功した。

一方、pLPSecGFPuv の場合、得られた Em 耐性形質転換体の培養上清に GFP 由来の緑色蛍光を検出できなかった。GFP の蛍光強度には温度、酸素濃度、pH が影響するという報告があったので [17]、培養温度の影響を 30°C と 37°C で、酸素濃度の影響を振とう培養の有無で検討した。また、pH 安定のために MRS 培地を 0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.7) で作製し、培養を行なった。しかし、いずれの条件においても GFPuv の緑色蛍光を検出できなかった。そこで、培養上清中に GFPuv が実際に発現しているかを抗 GFP 抗体を用いて WB 法で解析した。

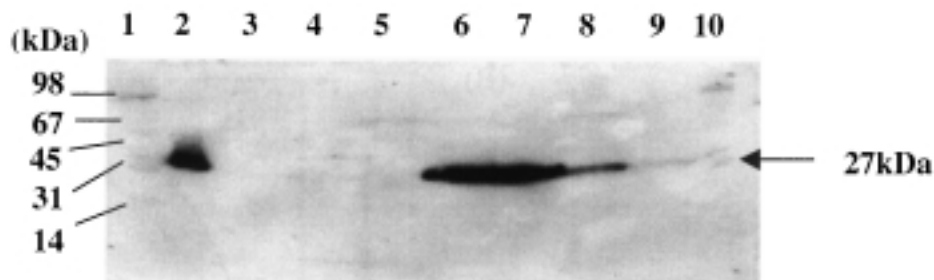


Fig. 7. Western blotting analysis of GFPuv from the supernatant of S-1 and S-1 harboring pLPsecGFPuv.

Lane1, 10: Precision Plus Protein Standards Dual Color, Lane2: GFP positive control (pGFPuv/*E.coli*), Lane3: MRS medium concentrated supernatant, Lane4: S-1 concentrated supernatant (37°C), Lane5: S-1 concentrated supernatant (37 °C ,airation), Lane6: S-1[pLPsecGFPuv] concentrated supernatant (30 °C), Lane7:S-1[pLPsecGFPuv] concentrated supernatant (30°C,airation), Lane8: S-1[pLPsecGFPuv] concentrated supernatant (37°C), Lane9: S-1[pLPsecGFPuv] concentrated supernatant (37°C, airation)

その結果、Fig. 7 の Lane 6~9 に示す様に、pLPsecGFPuv 導入 S-1 菌の場合、分泌発現量の差はあるが、試験したいずれの条件下でも培養上清に GFPuv が分泌していることが確認された。培養温度を 30°C と 37°C で比較した場合、30°C (Lane 6) で培養した方が 37°C (Lane 8) の場合よりも GFPuv の分泌発現量が多かった。これは GFPuv は低い培養温度の方が発現量が増加するということが、*L. casei* の菌体内発現の場合で報告されており [17]、S-1 菌の菌体外分泌においても同じであった。また 37°C においては S-1 菌が分泌するプロテアーゼの産生量が 30°C よりも多く、分泌した GFP の分解が促進されている可能性も考えられた。また、酸素濃度、すなわち、培養時における振とうの有無の影響については、30°C で培養した場合、振とうの有無での差異はなかった (Lane 6、7)。これは、30°C では GFPuv の合成が最適であるので GFPuv の発現量は酸素の有無による影響を受けなかったと考えられる。一方、37°C においては、Lane 9 の振とう培養したものは Lane 8 の振とうしなかった場合と比べて GFPuv の発現量は減少していた。これは酸素存在下では S-1 菌の成長が遅いことから、GFPuv の分泌発現量自体も減少したと考えられる。

以上、今回構築した分泌発現ベクター pLPsec は異種遺伝子として α -amylase と GFPuv の分泌発現を可能にした。しかし、今回、 α -amylase は生理活性を持った状態で分泌発現できたが、GFPuv は生理活性 (蛍光) を有して分泌発現しなかった。これらのことから、分泌させるタンパク質の種類によってはその生理活性を消失する可能性がある事が分かった。したがって、発現させる遺伝子によっては、生理活性を有した状態で発現する条件等を詳細に検討する必要があると思われる。

(5) 乳酸菌用分泌発現ベクターを用いた経口ワクチンの開発

次に、構築した分泌発現ベクターの応用の一環として、乳酸菌を抗原運搬体とする新しいタイプの経口粘膜コレラワクチンの開発を目標として、S-1 菌における cholera toxin (CT) の分泌発現を試みた。CT は *Vibrio cholerae* が産生する毒素蛋白質 (85kDa) で、27kDa の毒素活性部分 (CTA) と 11.6kDa のサブユニット (CTB) が 5 個で構成される 1A5B 型毒素である (Fig. 8) [18]。CTA は細胞内に侵入し、実際に毒素活性を示す活性本体部位である [19]。一方、CTB は細胞表面のレセプターである GM1 ガングリオシドと強く結合し、CT が細胞表面に吸着する役割を担っている。したがって 毒素活性を示さない CTB の分泌発現は、コレラに対する新しい安全なワクチンの開発に結びつく可能性がある。そこで数種類の CTB 発現プラスミド pCTXB の構築を行った。

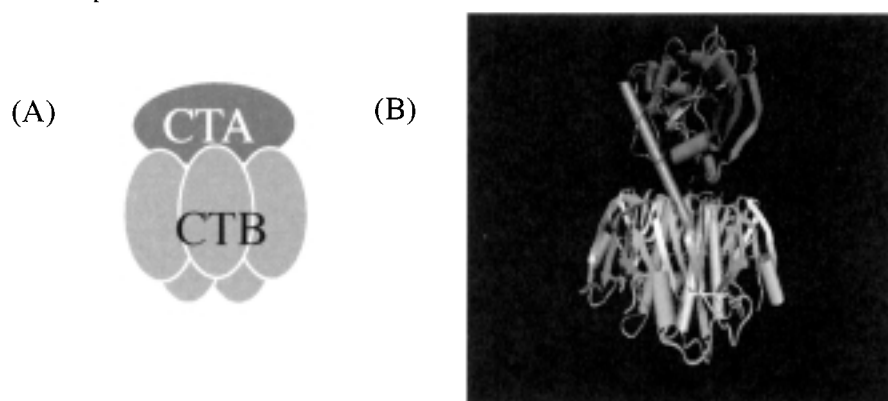


Fig. 8. (A) Structure model and (B) Carbon model of Cholera Toxin (1A5B) [18].

CTB 遺伝子 (*ctxB*) は *Vibrio cholerae* の染色体上に CTA をコードする *ctxA* とオペロン構造をとっている。CTB 遺伝子は分泌シグナル配列をコードする 63bp からなる Leader 配列と成熟体部分をコードする 311bp の mature 配列で構成されている (Fig. 9)。まず、pLPSec の発現

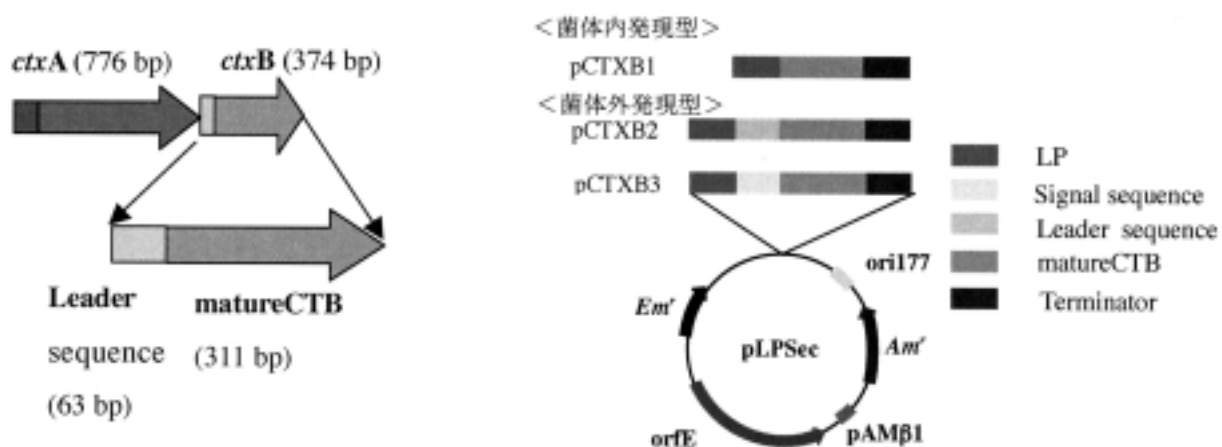


Fig. 9. Structure of *ctxA* and *ctxB* operon.

Fig. 10. Schematic representation of pCTXB1, 2, 3.

カセットに、CTB 遺伝子より Leader 配列部分を除いた matureCTB の遺伝子配列だけを導入し、菌体外分泌発現型の pCTXB3 の構築をした。次に、Leader 配列をそのまま分泌シグナルとして利用するために、pLPSec の発現カセットより glcNAcaseSS 部位を除き、Leader 配列を含む CTB 遺伝子全体を導入した pCTXB2 を構築した。また、菌体内発現型として、pLPSec より発現カセットの glcNAcaseSS 部位を除き、matureCTB の遺伝子配列だけを導入した pCTXB1 を構築した (Fig. 10)。以上、構築した pCTXB1、pCTXB2 及び pCTXB3 をエレクトロポレーション法により S-1 菌に導入し、得られた Em 耐性形質転換体を 10mL の MRS 培地 (0.2M リン酸カリウム緩衝液、pH 6.7 で作製) で 48 時間培養した。培養後、上清を Amicon-Ultrara-15 (MILIPORE) を用いて濃縮した後、SDS-PAGE に供し、抗 CT 抗体 (Sigma) を用いた WB 法で CTB の検出を行った。その結果 Fig. 11 の Lane 6 に示すように、pCTXB3 導入 S-1 菌において、CTB の 1 量体の分子量である 11kDa の位置にバンドが検出された。通常、CTB は 5 量体を形成しており、また、5 量体における単量体間の結合も強固なことから、SDS-PAGE に供した場合でも、そのバンドは 1 量体の位置ではなく、約 44kDa の位置に検出されることが報告されている [20]。しかし、今回の pCTXB3 導入 S-1 菌の場合、検出されたバンドは約 11kDa であったので、CTB は 1 量体で分泌発現していると考えられた。一方、Lane 4 に示す pCTXB1 導入 S-1 菌や Lane 5 に示す pCTXB2 導入 S-1 菌においては、CTB のバンドは検出されなかった。すなわち、pCTXB1 においては分泌シグナルコード配列が存在しないので、CTB が培養上清に分泌されなかったためであり、また、pCTXB2 においては、分泌シグナルとしてグラム陰性菌である *Vibrio cholerae* の CTB 遺伝子由来の Leader 配列を用いたため、グラム陽性菌である S-1 菌では、分泌シグナルとして機能しなかったと考えられる。

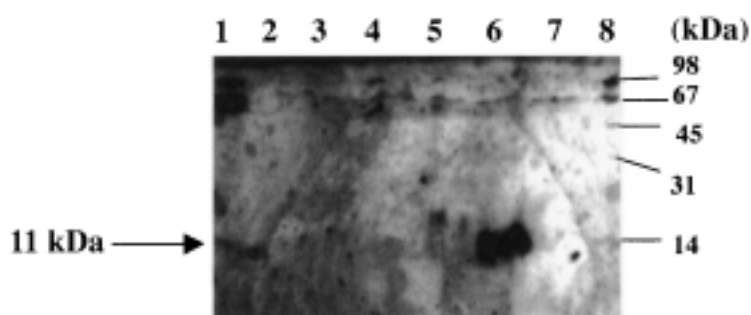


Fig. 11. Western blotting analysis of CTB from concentrated supernatant of S-1.

Lane1: CTB positive control (pET41.a/CTB/*E.coli*), Lane2: S-1 concentrated supernatant, Lane3: S-1[pLPSec] concentrated supernatant, Lane4: S-1[pCTXB1] concentrated supernatant, Lane5: S-1[pCTXB2] concentrated supernatant, Lane6: S-1[pCTXB3] concentrated supernatant, Lane7: MRS medium concentrated supernatant, Lane8: Precision Plus Protein Standards Dual Color.

今回、我々が構築した pLPSec は CTB を 1 量体ではあるが、培養上清に分泌させる事ができた。CTB は 1 量体ではワクチンとしての抗原性は低いかもしれないが、CT の GM1 への結合を阻害するブロック剤としては機能する可能性がある。

以上、抗原分泌発現ベクターを導入した抗原分泌乳酸菌はコレラを始めとする腸管内感染症に対する新しいワクチンの開発へ応用できると考えられる。また、このようなワクチンへの開発には、導入した宿主菌が、作用部位である腸管内で生存して、十分な抗原刺激を提示して、その部位で機能を発揮することができ、また、生体内に対する安全性が保証されていることが必要である[21、22、23]。今回の乳酸菌を抗原運搬体として用いる場合も、組み込む抗原を菌体のどの箇所で発現するかは重要である。我々の構築した分泌発現ベクターは乳酸菌体外へ抗原を提示できる。つまり、生きた乳酸菌が腸管内で抗原を分泌産生し、継続的に生体に対して抗原刺激を与えることが期待できる。さらに CTB には、アジュバントとしての性質もあり [24]、CTB を腸管粘膜で分泌する事により、非特異的な免疫賦活化作用としての利点も期待できる。つまり、CTB を他の抗原と共に発現させると、抗原に対する IgA を主とした粘膜特異的免疫 [25] に加えて血清 IgG を主とした全身免疫も高まることが期待できる。さらに、詳細なメカニズムは解明されていないが、CTB によって免疫寛容が抑制されるという報告 [25] もあり、この点からも興味深い。

今後、実際に CTB 発現乳酸菌をマウス等に経口投与して、腸管内での CTB の発現確認や血清中の特異的 IgG や IgA の抗体価の測定が必要である。さらに、抗体価が最大の時に、実際にマウス等をコレラ毒素もしくは *Vivrio cholerae* に曝露させ、コレラに耐性であるかの検討も必要である。

結語

遺伝子組換え微生物のヒトへの臨床応用には、第一に安全性が必要である。乳酸菌自身は安全性や倫理的にもヒトへの医薬品の応用が可能であるが、現在の分泌発現ベクターには薬剤耐性遺伝子が存在するので、これを 栄養要求性マーカーなどの安全なマーカーに交換する、もしくは染色体組み込みベクターを利用することなどが、今後必要となるであろう。

感染症予防のワクチンとしては、有効な経口投与ワクチンが極めて少数であるのが現状である。本論文で構築した乳酸菌におけるタンパク質分泌発現ベクターは、乳酸菌を抗原運搬体とした新しい経口ワクチン開発などに貢献が出来ると思われる。

謝辞

本稿を纏めるにあたり、福岡大学薬学部 見明史雄教授、鹿志毛信広助教授、中島学助教授、佐藤朝光助手、琉球大学遺伝子実験センター 新川武助教授に深謝いたします。また、共同研究者諸氏に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] L. Gold, J.A. Stader, T.J. Silhary & F.W. Studier. *Methods in Enzymology*, 1990; 185, Academic Press, New York: 11-195
- [2] Simonen M, Palva I. Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol Rev.* 1993 Mar; 57(1): 109-37. Review.
- [3] Priest FG. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev.* 1977 Sep; 41(3): 711-53.
- [4] Hols P, Slos P, Dutot P, Reymund J, Chabot P, Delplace B, Delcour J, Mercenier A. *Microbiology.* 1997 Aug; 143 (Pt 8): 2733-41.
- [5] Maassen, C. B., Laman, J. D., den Bak-Glashouwer, M. J., Tielen, F. J., van Holten-Neelen, J. C., Hoogteijling, L., Antonissen, C., Leer, R. J., Pouwels, P. H., Boersma, W. J. and Shaw, D. M. *Vaccine.* 1999 Apr 23; 17(17): 2117-28.
- [6] Ahmed FE. *Trends Biotechnol.* 2003 Nov; 21(11): 491-7. Review.
- [7] Seegers JF. *Trends Biotechnol.* 2002 Dec; 20(12): 508-15. Review.
- [8] Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M, Heijne den Bak-Glashouwer MJ, Tielen FD, Smit E, Martinez B, Jore J, Conway PL. *Int J Food Microbiol.* 1998 May 26; 41(2): 155-67.
- [9] Senba M, Kashige N, Nakashima Y, Miake F, Watanabe K. *Biol Pharm Bull.* 2000 May; 23(5): 527-31.
- [10] Ullmann A, Tillier F, Monod J. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Oct; 73(10): 3476-9.
- [11] Kashige N, Nakashima Y, Miake F, Watanabe K. *Arch Virol.* 2000; 145(8): 1521-34.
- [12] Rosochacki SJ, Matejczyk M. *Acta Microbiol Pol.* 2002; 51(3): 205-16.
- [13] Larocca D, Burg MA, Jensen-Pergakes K, Ravey EP, Gonzalez AM, Baird A. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002 Mar;3(1):45-57. Review.
- [14] Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. *Vaccine.* 2005 Mar 18; 23(17-18): 2042-8. Review.
- [15] Bernfeld, P. (1955) *Methods in Enzymology* 1, 149-158
- [16] Siezen RJ. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999 Jul-Nov; 76(1-4): 139-55. Review.
- [17] Perez-Arellano I, Perez-Martinez G. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 May 16; 222(1): 123-7.
- [18] <http://www.rctb.net/links.htm>
- [19] Jertborn M, Svennerholm AM, Holmgren J. *Vaccine.* 1992; 10(2): 130-2.
- [20] Seegers JF. *Trends Biotechnol.* 2002 Dec; 20(12): 508-15.
- [21] Slos P, Dutot P, Reymund J, Kleinpeter P, Prozzi D, Kieny MP, Delcour J, Mercenier A, Hols P. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 Dec 1; 169(1): 29-36.
- [22] Marteau P, Rambaud JC. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep; 12(1-3): 207-220.
- [23] Gasson, M.J. *FEMS Microbiol Rev* 1993 Sep; 12(1-3): 3-20.
- [24] Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C. *Vaccine.* 1993 Sep; 11(12): 1179-84.
- [25] Seegers JF. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol.* 2002 Dec; 20(12): 508-15.