

ヒト腸管レクチンの腸内細菌共生系の賦活化作用に関する研究

お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科自然・応用科学系・准教授 相川 京子

■ 目的

消化管粘膜は飲食とともに摂取される病原体を排除し、侵入・増殖を阻止する機構を持つとともに、特定の菌種は排除されずに定住し、腸内フローラ(細菌叢)を形成して宿主と共生関係を築いている。共生細菌は栄養素や生活空間の獲得を病原菌と競合することで、さらには有機酸などの抗菌物質を産生することで病原菌の宿主への感染を防いでいる。また、未消化食事成分を代謝して宿主にビタミンや栄養素を供給していること、消化管の粘膜免疫誘導組織の成熟に深く関わることも明らかにされており、粘膜における細菌の共生はヒトの健康維持にとって重要である。

本研究では、特定の菌種が粘膜で排除されずに増殖する一方、上皮細胞層を超えて侵入(感染)せず、粘膜層にとどまる「共生」機構を明らかにするために、ヒト膵臓や消化管に発現されているレクチン ZG16p と ZG16B に着目し、細胞からの分泌性や腸内細菌の増殖性への作用に関して研究を行った。

■ 方法

(1) 細胞発現用ベクターの作成とトランスフェクション

真核細胞発現用ベクター pEXPR-IBA103 にヒト ZG16p とヒト ZG16B をコードする遺伝子配列を組み込み、ストレプトタグ(ST)付加 ZG16p、ZG16B を発現するベクターを作成した。これらのベクターを CHO-K1 細胞(ハムスター卵巣由来細胞)、Caco2 細胞(ヒト大腸癌由来細胞)にリポフェクタミンを用いてトランスフェクションし、ZG16p、ZG16B を発現させた。

腸上皮細胞における ZG16p の機能を調べるためのモデル細胞を作成するために、ZG16p の安定発現株を作成した。トランスフェクション後、G418 を含む培地で培養し、シングルクローニングを行い、安定発現株を二つ樹立した。

細胞内局在を抗 ST 抗体、FITC 標識二次抗体を用いた細胞染色により調べた。細胞の培養液中に分泌された ZG16p、ZG16B をイムノブロットング法により検出した。

(2) 乳酸菌増殖試験

大腸菌発現系ベクター pASK-IBA5plus にヒト ZG16p とヒト ZG16B をコードする遺伝子配列を組み込み、発現ベクターを作成した。それらを用いて ST が付加されたりコンビナントタンパク質を大腸菌 DH5 α に発現させ、ストレプトタグチンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

乳酸菌 6 種について、培地に ZG16p を添加(3 μ g/mL)し、経時的に 600nm の吸光度を測定して増殖性を調べた。

■ 結果および考察

CHO-K1 細胞に ZG16p、ZG16B を強制発現させたところ、トランスフェクション後 48～72 時間で発現が最も高く、また産生された ZG16p、ZG16B は細胞外へ分泌されることがわかった。また、ZG16B はカルボキシ末端領域で糖鎖修飾を受け、糖鎖修飾が分泌性に影響することが明らかになった。また、Caco2 細胞においても ZG16p は細胞外に分泌されることがわかり、消化管においても粘膜中に分泌されることが推定された。ZG16p については消化管ムチンと結合して粘膜層に局在することも報告されており、ムチンをリザーバーとして粘膜層で濃縮され、腸内共生系の調節に働く可能性が推定された。

ZG16p を培地に添加して乳酸菌を培養したところ、特定の種類の乳酸菌で増殖抑制が観察された。今後、ZG16p が乳酸菌の生育にどのような機構で関わっているのかを分子レベルで明らかにしていきたいと考えている。

■ 結語

ヒト腸管に発現されている ZG16p、ZG16B は、生合成後に細胞外へ分泌され、消化管粘膜に局在して腸内細菌の生育、定着を調節することが推定された。