

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21043

研究課題名(和文) 微生物分泌性ナノ粒子を用いた標的細胞制御技術の基盤構築

研究課題名(英文) Construction of a technology controlling specific cells using bacterial nanoparticles.

研究代表者

田代 陽介 (TASHIRO, YOSUKE)

静岡大学・工学部・助教

研究者番号：30589528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微生物から分泌されたベシクルの標的指向性を解明するとともに、標的の微生物細胞へ物質を運搬するツールとしてベシクルを利用法できるようその技術基盤を構築することを目的とした。Enterobacteriaceae科に属する細菌のベシクルは、同属の細菌に選択的に取り込まれる事が示された。当細菌におけるベシクルの特異的結合メカニズムを解析したところ、ベシクルと細菌間での低い静電的反発力が示された。さらに、ベシクルに抗生物質を保持させることにより、特定の細菌に対してのみ殺菌効果を示した。以上の結果から、標的細胞に物質を送達するツールとしてのベシクルの有用性が示された。

研究成果の概要(英文)： In this study, the specificity of the membrane vesicle (MV)-cell interactions was investigated and the potential of MVs to target bacterial cells for delivery was evaluated. MVs derived from the enterobacterium specifically interacted with cells of the parent strain, but interacted less specifically with the other species tested in this study. The specific interaction of MVs with bacterial cells was explained in terms of interaction energy. Moreover, the specific interaction enabled the use of antibiotic-associated MVs to effectively kill target bacterial species. Altogether, this study provides the evidence that MVs selectively interact with target bacterial cells and offer a new avenue for controlling specific bacterial species using bacterial MVs in microbial communities.

研究分野：微生物工学

キーワード：ナノ粒子 ベシクル 微生物 水平伝播

1. 研究開始当初の背景

細菌・古細菌を含めた多くの微生物細胞は細胞外にナノ粒子であるベシクルを分泌する。ベシクルは微生物由来のリン脂質二重層とタンパクから構成される直径 20 ~ 200 nm の生体膜小胞であり、DNA、タンパク、低分子化合物等のシグナル物質が高濃度に含有されている。そして離れた微生物細胞に物質を運搬する微生物間情報伝達ツールとして機能している。

ベシクルの分泌に関しては世界中でその機構解明が行われてきたが、細胞への融合機構に関して、ほとんど研究が行われていない。申請者らはこれまでに代表的な 40 細菌株を対象に、細菌から分泌されたベシクルの微生物細胞吸着性を解析した。その中で、腸内細菌科細菌 *Buttiauxella agrestis* CUETM77167 株は他の微生物細胞に比べて、自身の細胞に高い吸着性を示す事を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、微生物分泌性ベシクルの特徴的な性質を用いて、多数の微生物種が混在する複合微生物系において標的の微生物種のみを制御可能な新規技術の基盤を構築する。具体的には、自身の細胞へ特異的融合を示すベシクルを分泌する腸内細菌 *B. agrestis* CUETM77167 株をモデル細菌として用い、その種特異的融合の決定要因を特定するとともに、ベシクルに抗生物質を保持させ複合微生物系内の標的微生物細胞のみを殺菌する新規技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) 微生物の培養

各細菌の培養には TSB 培地を用いた。

(2) ベシクルの抽出と精製

微生物培養液を遠心した後、その上清をフィルター滅菌し、超遠心することによりベシクルを回収した。また、iodixanol を用いた密度勾配遠心によりベシクルの精製を行った。

(3) ベシクルの細胞結合度測定

ベシクルを膜脂質染色試薬 FM4-64 で染色し、洗浄したベシクルを各微生物細胞と反応させた。微生物細胞を洗浄し、プレートリーダーで FM4-64 蛍光強度を測定することにより細胞に結合したベシクル量を評価した。

(4) ベシクルの細胞結合の観察

蛍光試薬 fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識したベシクルを細胞と反応させ、添加したベシクルを FITC 抗体により金コロイド標識し、透過電子顕微鏡で観察した。

(5) 粒子の物理化学的解析

細胞とベシクルの粒子径ならびにゼータ電位を、Zetasizer Nano ZS を用いて解析した。また、粒子間の全相互作用エネルギーを Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) 理論に基づいて算出した。

(6) ベシクルを介した抗生物質伝達

ゲンタマイシン保持型ベシクル (g-MVs)

を各細菌に反応させ、各々の生育阻害を調べる事によりベシクルを介した抗生物質伝達能を評価した。CUETM77-167 および *E. coli* DH5α を 1:1 で混合した懸濁液に g-MVs を反応させ、ベシクルの細胞選択的な物質運搬能も検証した。

4. 研究成果

(1) ベシクルの種特異的細胞結合

ベシクルと細胞間における結合面での相互作用を解析するために、蛍光色素 FITC でラベルしたベシクルを細胞に反応させ、FITC を標識する免疫電子顕微鏡法により観察を行った。その結果、細胞への融合過程と見られるベシクルが金コロイドで標識されたことから (図 1)、CUETM77-167 株のベシクルは細胞に結合するだけでなく内包物質を運搬している可能性が示唆された。

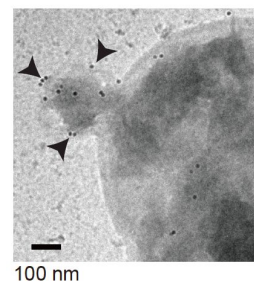


図 1 FITC 標識した CUETM77-167 株由来のベシクルと CUETM77-167 細菌との相互作用の金コロイド標識免疫電子顕微鏡写真。は金コロイドを示す。スケールバー:100 nm。

(2) 細胞とベシクルの静電的相互作用

細胞-ベシクル間における特異的結合の要因を解析するにあたり、粒子間の静電相互作用の影響を評価した。DLVO 理論に基づく、二粒子間の凝集と分散は静電的反発力とファンデルワールス力の和で表される。*B. agrestis* が分泌するベシクルおよび数種の微生物細胞の粒子径・ゼータ電位を測定し、二粒子間における全相互作用エネルギーを DLVO 理論に基づき計算したところ、*B. agrestis* 細胞に対する極大エネルギーが著しく低かった (図 2)。以上の結果から、*B. agrestis* における特異的なベシクル-細胞結合の要因の一つとして静電的相互作用が示された。

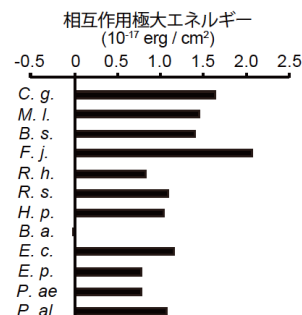


図 2 CUETM77-167 株由来のベシクルと各細菌

との相互作用エネルギー。C. g., *Corynebacterium glutamicum* AJ2247; M. l., *Micrococcus luteus* JCM 1464; B. s., *Bacillus subtilis* C1; F. j., *Flavobacterium johnsoniae* JCM 8514; R. h., *Rhizobium halotolerans* JCM 17536; R. s., *R. soli* DS-42; H. p., *Hydrogenophaga pseudoflava* GA3; B. a., *Buttiauxella agrestis* CUETM77-167; E. c., *Escherichia coli* MG1655; E. p., *Erwinia persicina* HK204; P. ae., *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; P. al., *P. alcaligenes* JCM 20561。

(3) *Buttiauxella* 属細菌におけるベシクル細胞相互作用

ベシクルと細菌の特異的結合が、他の *Buttiauxella* 属細菌にも見られるか検証した。その結果、本研究で用いた全ての *Buttiauxella* 属細菌で大腸菌に比べて高いベシクル取り込み量が観察された。また、DLVO 理論に基づく静電相互作用が低い細菌種においても高い結合度が見られたことから(図3) 静電的反発力以外の要因もベシクル-細胞結合に関与している可能性が考えられた。

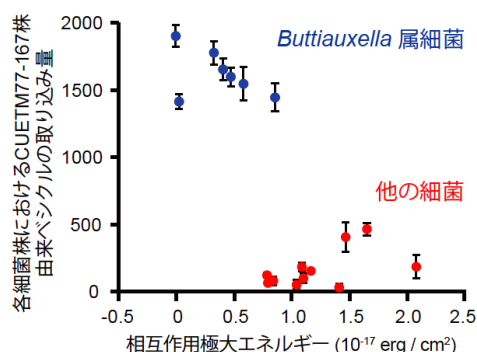


図3 各細菌における CUETM77-167 株由来のベシクルの取り込み量と相互作用エネルギー。

(4) ベシクルを介した選択的殺菌効果

CUETM77-167 株由来のベシクルにおける細胞選択的な物質運搬がドラッグデリバリーに適用可能か検証するために、g-MVs による各細菌の殺菌効果を比較した。その結果、CUETM77-167 株は大腸菌や緑膿菌に比べて g-MVs による高い殺菌効果が確認された。また、CUETM77-167 株と大腸菌 DH5 α 株の混合懸濁液において、両者の抗生物質最小生育阻止濃度に差異は見られないかも関わらず、g-MVs は CUETM77-167 株に対して選択的な殺菌効果を示した(図4)。

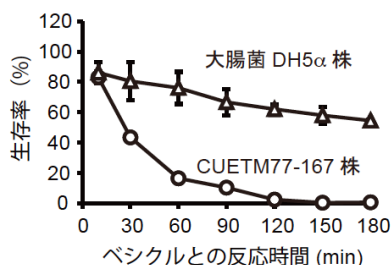


図4 *B. agrestis* CUETM77-167 株と *E. coli* DH5 α 株の混合液におけるゲンタマイシン保持型ベシクル(g-MVs)による殺菌効果。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1) Yosuke Tashiro, Yusuke Hasegawa, Masaki Shintani, Kotaro Takaki, Moriya Ohkuma, Kazuhide Kimbara, Hiroyuki Futamata. Interaction of bacterial membrane vesicles with specific species and their potential for delivery to target cells. **Frontiers in Microbiology** 8:571 (2017) 査読有
- 2) Yosuke Tashiro, Hiroaki Eida, Satoshi Ishii, Hiroyuki Futamata, Satoshi Okabe. Generation of small colony variants in biofilms by *Escherichia coli* harboring a conjugative F plasmid. **Microbes and Environments** 32:40-46 (2017) 査読有
- 3) Fatma A Aziz, Kenshi Suzuki, Akihiro Ohtaki, Keita Sagegami, Hidetaka Hirai, Jun Seno, Naoko Mizuno, Yuma Inuzuka, Yasuhiro Saito, Yosuke Tashiro, Akira Hiraishi, Hiroyuki Futamata. Interspecies interactions are an integral determinant of microbial community dynamics. **Frontiers in Microbiology** 6:1148 (2015) 査読有
- 4) Masanori Toyofuku, Yosuke Tashiro, Yusuke Hasegawa, Masaharu Kurosawa, Nobuhiko Nomura. Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. **Advance in Colloid and Interface Science** 226:65-77 (2015) 査読有
- 5) Yusuke Hasegawa, Hiroyuki Futamata, Yosuke Tashiro. Complexities of cell-to-cell communication through membrane vesicles: implications for selective interaction of membrane vesicles with microbial cells. **Frontiers in Microbiology** 6:633 (2015) 査読有
- 6) Hiromu Oura†, Yosuke Tashiro† (†equally contributed), Masanori Toyofuku, Kousetsu Ueda, Tatsunori Kiyokawa, Satoshi Ito, Yurika Takahashi, Seunguk Lee, Hideaki Nojiri, Toshiaki Nakajima-Kambe, Hiroo Uchiyama, Hiroyuki Futamata and Nobuhiko Nomura. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility through 1-naphthol and other bicyclic compounds bearing hydroxyl groups. **Applied and Environmental Microbiology** 81:2808-2818 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

- 1) 高木航太郎、長谷川雄将、二又裕之、田代陽介「微生物分泌性カプセルを介した

- 細胞への物質運搬機構の解明」静岡ライフサイエンスシンポジウム No. P-25 (静岡大学、静岡、2017年3月5日)
- 2) 塩田拓也、田代陽介、新谷政己、二又裕之、金原和秀「微生物が分泌するカプセル様構造体の多様性」静岡ライフサイエンスシンポジウム No. P-26 (静岡大学、静岡、2017年3月5日)
 - 3) 田代陽介、長谷川雄将、高木航太郎、二又裕之「微生物が形成するベシクルの選択的結合と情報伝達」膜シンポジウム No. 203 (関西大学、吹田、2016年12月2日)
 - 4) 田代陽介、長谷川雄将、高木航太郎、二又裕之「細菌-膜小胞間相互作用の動態と情報伝達機構の解析」日本生物物理学会 No. 1Pos197 (つくば国際会議場、つくば、2016年11月25日)
 - 5) 田代陽介「膜小胞を介した選択的情報伝達」日本細菌学会総会 (大阪国際交流センター、大阪、2016年3月24日)
 - 6) Atsuyoshi Nagao, Yusuke Hasegawa, Kenshi Suzuki, Yuma Inuzuka, Hiroyuki Futamata, Yosuke Tashiro “Novel factors related to biofilm formation in *Escherichia coli*” Inter-Academia Asia: The 2nd Conference, P2 (静岡大学、静岡、2015年12月1日)
 - 7) 長谷川雄将、新谷政己、大熊盛也、金原和秀、二又裕之、田代陽介「微生物分泌性ベシクルおよび細胞間における選択的相互作用の解析」膜シンポジウム No.P-8 (神戸大学、神戸、2015年11月25日)
 - 8) Atsuyoshi Nagao, Yusuke Hasegawa, Kenshi Suzuki, Yuma Inuzuka, Hiroyuki Futamata, Yosuke Tashiro “Analysis of an adhesion protein synthetic factor related to biofilm formation in *Escherichia coli*” ASM Biofilm Conference, PS12 (Hyatt Regency Chicago, Chicago, 2015年10月26日)
 - 9) 永尾篤義、長谷川雄将、鈴木研志、犬塚友麻、二又裕之、田代陽介「アミロイドタンパク形成に關与する新規因子の解析」日本微生物生態学会 No. PL-209 (土浦亀城プラザ、土浦、2015年10月18日)
 - 10) 田代陽介、岡部聡「大腸菌における休眠細胞と半休眠細胞」日本微生物生態学会 (土浦亀城プラザ、土浦、2015年10月20日)
 - 11) Yusuke Hasegawa, Masaki Shintani, Moriya Ohkuma, Kazuhide Kimbara, Hiroyuki Futamata, Yosuke Tashiro “Development of microbial particles for a drug delivery system” InterAcademia, P1-1 (アクトシティ、浜松、2015年9月29日)
 - 12) Yusuke Hasegawa, Masaki Shintani, Moriya Ohkuma, Kazuhide Kimbara, Hiroyuki Futamata, Yosuke Tashiro “Selective and effective transfer of signal substances

among microbes with membrane vesicles” Water and Environmental Technology Conference, No. 3B-16 (日本大学駿河キャンパス、東京、2015年8月5日)

- 13) 長谷川雄将、新谷政己、大熊盛也、金原和秀、二又裕之、田代陽介「微生物分泌性ベシクルを用いた標的細胞制御技術の構築」環境バイオテクノロジー学会 No. O-07 (東京大学、東京、2015年6月29日)
- 14) 永尾篤義、長谷川雄将、鈴木研志、犬塚友麻、二又裕之、田代陽介「バイオフィルム形成に關わる細胞外凝集タンパク合成關連因子の探索」環境バイオテクノロジー学会 No. P-17 (東京大学、東京、2015年6月29日)
- 15) 永尾篤義、長谷川雄将、鈴木研志、犬塚友麻、二又裕之、田代陽介「大腸菌のバイオフィルム形成および curli 生産に關わる新規因子の探索」大腸菌研究会 No. P39 (琵琶湖グランドホテル、大津、2015年6月4日)
- 16) 長谷川雄将、新谷政己、大熊盛也、金原和秀、二又裕之、田代陽介「微生物が分泌する細胞外ベシクルの特性および生理学的機能の解析」日本膜学会 No. P64S (早稲田大学、東京、2015年5月14日)

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Masanori Toyofuku, Yosuke Tashiro, Tomohiro Inaba, Nobuhiko Nomura. “Bacterial interactions” In: Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science, Volume 1. P.68-81 Edited by Hiroyuki Ohshima. Wiley. 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://cheme.eng.shizuoka.ac.jp/wordpress/tashiro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 陽介 (TASHIRO, Yosuke)

静岡大学・工学部・助教

研究者番号：30589528

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし