

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14885

研究課題名(和文)特殊環境微生物由来テーラーメイド膜小胞を用いた低温膜タンパク質生産系の開発

研究課題名(英文)Development of membrane-protein production system at low temperatures via bacterial tailor-made membrane vesicles

研究代表者

川本 純 (Kawamoto, Jun)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：90511238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細菌は、菌体外に膜で覆われた 50-200 nm の粒子を生産し、菌体外膜小胞 (OMV) と呼ばれている。Shewanella sp. HM13 が生産する OMV は、機能未知膜タンパク質 P49 を、ほぼ単一の積荷タンパク質として分泌していた。本研究では、本菌による P49 選択的な OMV 輸送機構を利用した異種タンパク質生産系の開発に取り組んだ。本菌について、eGFP 融合型 P49 生産株を作製し、融合型タンパク質の OMV 以降を解析した結果、融合タンパク質は OMV に以降したことから、本菌による積荷選択的 OMV 移行は、異種タンパク質生産に応用可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は、エネルギー生産や呼吸、シグナル伝達といった生物にとって重要な生理機能を担うものが多い。一方で、個々の膜タンパク質の機能発現メカニズムや立体構造の理解は限定的である。これは、疎水性に富む膜タンパク質を生化学実験にもちいるのに十分量を調製することが困難であることが大きい。現在までに大腸菌や酵母、昆虫細胞や無細胞タンパク質生産システムといった多様な異種タンパク質生産システムが利用されているが、種々の解析にもちいる程の生産量が見込まれるものは少ない。本研究では、菌体外膜小胞を高生産する低温菌を宿主とする異種タンパク質生産システムを構築した。

研究成果の概要(英文)：Shewanella sp. HM13, a cold-adapted bacterium isolated from intestine of Horse mackerel, secretes membrane vesicles harboring a functionally unknown membrane protein, P49, as a single major cargo. In this study, we developed a heterologous protein production system via the vesiculation of this strain. When eGFP-fused P49 producing strain was constructed by homologous recombination, the fusion protein was localized at the membrane vesicle fraction, indicating that P49-selective cargo loading system is available for secretion protein production system via the vesiculation.

研究分野：応用微生物学

キーワード：outer membrane vesicles Shewanella psychrotroph

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は呼吸やエネルギー生産、外部の環境変化を細胞内に伝達するシグナル伝達など、多様な生理機能を担う。これらは生物の生存において重要なだけでなく、様々な疾病にも関与することから、膜タンパク質の生理機能解析や構造解析が積極的に進められている。一方で、これらの膜タンパク質について生化学的研究を行うためには、高収率、高純度の膜タンパク質生産系が必要であるが、現在主に異種タンパク質生産に利用されている大腸菌や酵母、昆虫細胞を宿主とした系では、十分生産されるケースは希である。さらに、メンブレンディスクを応用した膜タンパク質の無細胞タンパク質生産システムが開発されているが、合成されるタンパク質が限定的であり、かつコストの高さから効率的なタンパク質調製法とはいえない。このような背景のもと、効率的な膜タンパク質生産系の確立を目的とし、細菌が生産する菌体外膜小胞 OMV に着目した。OMV は膜に覆われた 50-200 nm の粒子で、主に外膜タンパク質、表層糖脂質、リン脂質で構成される。OMV の積荷として細胞外に分泌される生体分子は種によって異なるが、病原性因子やバイオフィーム制御因子といった細菌の生存戦略に関わる因子を分泌し、宿主間、もしくは細菌間コミュニケーションに利用されている。また、OMV は細菌の外膜を模倣した表層構造であることから、ワクチンとしての応用や、OMV をプラットフォームとし表層に種々の酵素を呈示したナノリアクターの開発などが期待される新しい微生物機能である。本研究では、細菌による OMV 生産を利用した異種タンパク質、特に異種膜タンパク質を OMV の積荷とし、細胞外に分泌することで、標的膜タンパク質を OMV の膜中に成熟型として内包することが可能と考え、OMV 生産菌を宿主とした異種タンパク質生産系の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

効率的な膜タンパク質生産系を開発するために、回遊性魚類の腸管より採取した *Shewanella* sp. HM13 を宿主としたタンパク質生産系を構築することとした。本菌は、4-25°C で良好に生育する低温菌であり、近縁の *Shewanella* 属細菌に比べ、OMV 生産性に秀でた株である。さらに、本菌の OMV には、機能未知の膜タンパク質 P49 がほぼ単一の積荷タンパク質として分泌されていた。以上のことから、本菌は P49 選択的な OMV 移行システムを有していることがわかった。本研究では、*Shewanella* sp. HM13 の OMV を介した P49 選択的な分泌システムを異種タンパク質生産に応用することとした。積極的に本菌の P49 輸送システムを活用するために、本研究では、本菌の全ゲノム配列から P49 周辺遺伝子の網羅的破壊から、P49 選択的な OMV 移行システムの分子基盤の解明と、異種タンパク質生産への応用可能性を検証することとした。さらに、本菌ゲノム上の P49 遺伝子 (*hm3347*) の 3' 末端に異種タンパク質を導入した融合タンパク質について、OMV への輸送を評価することで、本菌の OMV 生産システムをタンパク質生産への応用可能性について解析した。

3. 研究の方法

3-1) P49 選択的 OMV 輸送における積荷タンパク質 P49 周辺遺伝子の生理機能

本菌の全ゲノム解析の結果、*hm3347* は糖脂質の生合成や、タンパク質の分泌、リン脂質の修飾およびタンパク質輸送との関連が未知の遺伝子群で構成される遺伝子クラスターに存在した。これらの周辺遺伝子が、OMV を介した P49 選択的輸送に関与することが示唆されたことから、周辺遺伝子の網羅的破壊を試みた。*Shewanella* sp. HM13 の リファンピシン耐性株を獲得し、本菌株を親株とした遺伝子破壊系を構築した。遺伝子破壊用プラスミド pKNOCK ベクターを、大腸菌 S17-1/*λpir* との接合伝達により親株に導入し、相同組み替えにより目的遺伝子を破壊した。獲得した各遺伝子破壊株を 18°C で培養し、菌体と培養上清を分画した。培養上清を超速遠心により、OMV 画分と上清 (Post-vesicle fraction, PVF) に分画し、それぞれを SDS-PAGE に供し、各画分における P49 の局在性をウエスタンブロッティングにより解析した。

3-2) OMV と P49 の *in vitro* 相互作用解析

OMV の表層を介した P49 との相互作用を解析することを目的とし、両者の共沈降解析を試みた。P49 遺伝子クラスターに存在する glycerophosphodiester phosphodiesterase 遺伝子破壊株 (*ΔgdpD*) の PVF を硫酸沈殿とゲル濾過クロマトグラフィーに供し、P49 の精製タンパク質を調製した。*Shewanella* sp. HM13 の野生株、および *wzx* 遺伝子破壊株 (*Δwzx*)、II 型タンパク質輸送装置のサブユニットのホモログ遺伝子欠損株 (*ΔgspE2*) の培養上清を超速遠心分離に供し、OMV を調製した。P49 の精製タンパク質と OMV を混合し、4°C で静置した後に、超速遠心に供し、上清と沈殿画分を調製した。両画分を TCA 沈殿により濃縮した後に、SDS-PAGE と抗 P49 抗体をもちいたウエスタンブロッティングにより、P49 と OMV との共沈降を解析した。

3-3) OMV を介した異種タンパク質融合型積荷タンパク質分泌システムの構築

本菌を宿主とし、OMV 生産を利用した異種タンパク質分泌生産系を構築するために、積荷タンパク質 P49 の C 末端に緑色蛍光タンパク質を導入した融合型タンパク質生産株の構築を試みた。*hm3347* の 3' 非翻訳領域より見いだされた予測プロモータ領域の下流に、eGFP 融合

型 P49 遺伝子を導入した発現用ベクターを構築した。さらに、本菌のゲノム上の *hm3347* 遺伝子の終止コドンの直前に、相同組み替えにより eGFP 遺伝子を導入した。さらに、P49 には OMV 特異的なタンパク質の組み込みを担うシグナル配列が存在すると予想し、C 末端トランケートに eGFP を融合した株を作製した。融合タンパク質の局在性については、上記実験 1 と同様に画分し、各画分について抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。

4. 研究成果

4-1) P49 選択的 OMV 輸送における積荷タンパク質 P49 周辺遺伝子の生理機能

P49 をコードする *hm3347* 遺伝子の周辺遺伝子群をそれぞれ破壊し、各遺伝子破壊株について、積荷タンパク質の局在性を解析した結果、細胞画分に P49 が濃縮した変異株と、PVF に P49 が濃縮した変異株の 2 種類の表現系を示した。細胞内に P49 が濃縮した表現系は、*hm3347* の上流に存在するタンパク質輸送装置のサブユニットのホモログ遺伝子の破壊株によって示された。これらのタンパク質はグラム陰性細菌に高度に保存されている II 型タンパク質輸送装置のサブユニット群をコードしている遺伝子と、機能未知遺伝子でコードされていた。II 型タンパク質輸送装置は、GspC~GspN までの 12 種のサブユニットで構成される輸送装置で、ペリプラズム空間から基質タンパク質を細胞外もしくは細胞表層への輸送を担う。*Shewanella* sp. HM13 のゲノムには、P49 に存在する遺伝子群以外に特徴的な II 型タンパク質輸送装置をコードする遺伝子クラスターが存在し、さらに、P49 含有遺伝子クラスターに存在する II 型輸送装置様タンパク質群は典型的な II 型輸送装置とは異なる遺伝子群により構成されており、II 型タンパク質輸送装置では必須の構成要素である一部のサブユニットを欠いていることから、新奇のタンパク質輸送装置である可能性が高い。本遺伝子クラスターにコードされるタンパク質輸送装置は、P49 をペリプラズム空間から外膜表層への輸送を担うことが示された。

一方で、P49 が PVF に濃縮した変異株は、同遺伝子クラスターに存在する糖脂質生合成関連遺伝子、リン脂質修飾関連遺伝子、その他タンパク質輸送や細菌の糖脂質、リン脂質との関連が未知の遺伝子の破壊によって獲得された。特に糖脂質の生合成に関与する遺伝子として、GlcNAc-1-phosphate transferase (*WecA*)や O 抗原糖鎖輸送タンパク質遺伝子 (*Wzx*) が存在した。*WecA* は細菌の表層糖脂質 (LPS, LOS) の生合成における初発反応を触媒するリン酸化酵素であり、*WecA* は内膜内葉から概要に表層糖脂質の前駆体を輸送するフリッパーゼと予想された。本菌においては、LPS の内膜外葉への反転輸送を担う ABC 輸送体 *MsbA*、大腸菌 *WecA* と高い相同性を示す 2 つの *WecA* をコードする遺伝子が、別の遺伝子座より見いだされたことから、本実験で破壊した *WecA* と *Wzx* は OMV 特異的な表層糖脂質の生合成や輸送に関与していることが示唆された。さらに、これらの遺伝子破壊株では、P49 は細胞外に輸送されるものの、OMV には組み込まれなかったことから、P49 は II 型輸送装置様タンパク質群の機能により外膜まで輸送された後に、P49 遺伝子クラスターに存在する *WecA* や *Wzx* によって制御される OMV 特異的な糖脂質との相互作用により、OMV に組み込まれることが示唆された。また、P49 含有遺伝子クラスターに含まれない *WecA* ホモログをコードする遺伝子を破壊した結果、破壊株は親株に比べて顕著に生育速度が低下した一方で、P49 は OMV 画分より回収されたことから、本菌には、細胞の主要な糖脂質の生合成を担う系と、OMV 特異的な糖脂質を生合成する系が存在することが示された。

4-2) OMV と P49 の *in vitro* 相互作用解析

P49 遺伝子の周辺遺伝子群の網羅的な破壊実験から、P49 は OMV 特異的に存在する表層糖脂質との相互作用により OMV に組み込まれることが予想された。本実験では、P49 と OMV 表層の相互作用を解析するために、*in vitro* 共沈降実験を行った。精製した P49 を、P49 欠損株由来の OMV を混合し、超速遠心分離に供した結果、P49 が沈殿画分より検出されたのに対して、OMV 非存在下で同様の操作を行った場合、超速遠心後の P49 は上清より検出された。II 型タンパク質輸送装置のサブユニットのホモログ遺伝子破壊した株より調製した OMV を同様の実験に供した結果、野生株と同様に、P49 は沈殿画分より検出されたのに対して、糖脂質合成関連遺伝子の破壊株 ($\Delta wzx2$) より調製した OMV との共沈降解析の結果、P49 は OMV とは共沈降せず、P49 は超速遠心分離後の上清より検出された。以上の結果から、P49 は OMV の表層糖脂質と相互作用し、OMV に組み込まれるが、P49 遺伝子クラスターに存在する糖脂質合成系によって合成される OMV 特異的な糖脂質の存在が必須であることが示された。さらに、P49 は細菌の糖脂質を認識する新奇の機構を有するタンパク質である可能性が示された。

4-3) OMV を介した異種タンパク質融合型積荷タンパク質分泌システムの構築

Shewanella sp. HM13 の OMV を介した P49 の輸送システムを異種タンパク質生産系に応用することで、目的タンパク質を高純度に調製可能と予想された。本研究では、P49 に eGFP を融合したタンパク質について、OMV への輸送を評価した。

融合型タンパク質を発現する組換え型 HM13 を作製するために、目的タンパク質を発現するベクターの構築を試みた。その結果、大腸菌をもちいたプラスミド構築システムでは、目的のプラスミドを調製することができなかった。この結果は、P49 プロモーターの制御下で融合タンパク質を発現するベクターを構築した際に、大腸菌内で発現した eGFP 融合型 P49 が宿主

毒性を有していることを示唆している。そこで、本研究ではゲノム上の P49 遺伝子 (*hm3347*) の 3' 領域に、相同組み換えにより eGFP 遺伝子を導入した。eGFP 融合型 P49 発現株について、実験 1 と同様に、融合型タンパク質の局在性を解析した結果、融合型タンパク質は OMV 画分より検出された。以上の結果は、P49 の分泌システムは異種タンパク質生産に応用可能であることを示している。さらに、P49 には、選択的に OMV と相互作用し、OMV によって輸送するための機能ドメインが存在する可能性を示している。P49 に存在する OMV 移行シグナル領域を探索するために、C 末端トランケートを作製し、融合型タンパク質の局在への影響を解析した。P49 は、データベース上のいずれのタンパク質とも相同性を示さない新奇のタンパク質であり、特徴的な機能ドメインの存在は *in silico* 解析では示されていない。P49 の二次構造予測の結果、本タンパク質の C 末端領域には 2 つの膜貫通型ヘリックス領域の存在が示された。P49 の C 末端から順次欠損させたトランケートタンパク質の OMV 局在性を解析した結果、C 末端側の 2 つのヘリックス領域の内、より C 末端に近いヘリックス領域 (TM2) の欠損が、融合型タンパク質の OMV 局在性を顕著に低下させることが明らかとなった。さらに、TM2 を欠損した融合型タンパク質は、PVF に濃縮していたことから、細胞表面における OMV 特異的な相互作用に P49 の TM2 が重要な機能を担うことがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 4 件)

1. Extremophiles 2016 11th International Congress on Extremophiles (2016/9/12-16)
“Analysis of Protein Secretion System of a Membrane-vesicle Producing Cold-adapted Bacterium, *Shewanella* sp. HM13”
Chen Chen, Jun Kawamoto, Tomoya Imai, Tatsuo Kurihara, 京都
2. 日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017/3/17-20)
“Analysis of a protein secretion mechanism via the membrane vesicle production of a cold-adapted bacterium, *Shewanella* sp. HM13”
Chen Chen, Soichiro KAWAI, Jun Kawamoto, Tomoya Imai, Tatsuo kurihara, 京都
3. 日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018/3/16)
“低温菌 *Shewanella* sp. HM13 の膜小胞輸送による選択的タンパク質分泌に関与する遺伝子の探索”
釜阪 紘平, Chen CHEN, 横山 文秋, 川本 純, 今井 友也, 小川 拓哉, 栗原 達夫, 名古屋
4. 日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018/3/16)
“低温菌 *Shewanella* sp. HM13 におけるベシクル分泌関連タンパク質の探索”
横山 文秋, 川本 純, 陳 晨, 今井 友也, 栗原 達夫, 名古屋

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名 : Dr. Maria Michela Corsaro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。