

令和元年6月14日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14869

研究課題名(和文)大腸菌の細胞外小胞と自己集合体形成に着目した有用物質生産プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of useful compound production process focused on outer membrane vesicles and self-assembly formation in Escherichia coli

研究代表者

尾島 由紘(Ojima, Yoshihiro)

大阪市立大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：20546957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸菌の外膜小胞と呼ばれる細胞外ナノ粒子を用いたタンパク質分泌生産プロセスの開発と、外膜小胞により形成誘導されるフロックと呼ばれる自己凝集体を用いた有害物分解反応を検討した。外膜小胞の生産では、膜関連遺伝子の2重欠損により約30倍に促進した。さらにヒトインターフェロンの組換え生産により、外膜小胞を介した分泌生産が可能であることを実証した。フロック形成では、有機リン系農薬であるパラチオンの中間分解物であるパラオキシソンの分解酵素ホスホトリエステラーゼをフロック表面に修飾させたが、分解反応速度は向上せず、活性を維持した状態での発現が課題として残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、学術的にも興味深い微生物の外膜小胞を利用した有用タンパク質の分泌生産を実証した点で、得られた研究成果の社会的意義は大きい。また外膜小胞が重要な役割を果たしているフロック形成に関しても、有害物分解酵素をフロック表面に発現可能であることを示した。このようなアプローチにより、微生物の自己凝集体であるフロックの機能修飾を提案したのは本研究が初めてであり、従来のバイオプロセスを新たな切り口から見直すという点で学術的意義を持ち、微生物が関与する分野・産業への波及効果は大きいものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, development of protein secretion production process using outer membrane vesicle (OMV) of Escherichia coli and harmful compound degradation using E. coli flocs induced by OMV were investigated. OMV production was promoted approximately 30 times by the double deletion of membrane-related genes. By the production of human interferon, we demonstrated that OMV could be applied for the secretion production of recombinant protein in E. coli. Next, a fused protein composed of an elongation factor Ts and phosphotriesterase (PTE) successfully expressed on the surface of E. coli flocs. However, PTE-displayed flocs did not promote the degradation reaction of paraoxon. Further trial is required for the application of E. coli flocs to harmful compound degradation.

研究分野：生物化学工学

キーワード：外膜小胞 フロック 大腸菌 タンパク質分泌生産 インターフェロン パラオキシソン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物の自己凝集体であるフロックは、活性汚泥法による水処理技術において産業的に利用されてきた。微生物のフロック形成能力は活性汚泥の性質に影響するが、自己凝集機構は明らかとなっていない点が多い。フロック形成能力は、活性汚泥等から単離された一部の環境微生物に限られ、発酵生産で用いられる工業生産菌に関しては、特殊な酵母を除きほとんど報告がない。バイオプロセスにおけるフロック形成の利点としては、微生物の固定化や分離回収が容易となる他、せん断応力など物理的ストレスへの耐性が向上する点が挙げられる。工業生産菌の中でも、大腸菌はアミノ酸や組み換えタンパク質生産の宿主細胞として広く利用され、遺伝子組換えおよび培養工学技術が最も進んだ微生物の1つである。大腸菌にフロックを形成させる技術としては、カチオン性のポリマーや、ポリ塩化アルミニウムなどの凝集剤が添加されるが、細胞生存率を著しく低下させる上、人体にも有害なものが多く、不要な微生物の回収・除去を目的として利用される。

研究代表者はこれまで、大腸菌のセルロース合成関連遺伝子である *bcsB* を過剰発現すると、グルコース存在下の懸濁培養の対数増殖期において、図1に示すような直径数 mm 程度の大腸菌の自発的なフロックが形成されることを発見した。この自発的な大腸菌フロックは、グルコース添加後4時間以内に誘導され、高い生存率を保っていることから死菌の凝集体などではない。さらに、その自己集合メカニズムについて検討を重ねた結果、外膜小胞(OMVs)と呼ばれる細胞外小胞の産生増加が形成のトリガーとなっていることを明らかにし、世界に先駆けて報告している。OMVsは、外膜が遊離した直径20~250 nmのナノ粒子で、外膜タンパク質やリポ多糖類・リン脂質によって構成され、主にグラム陰性細菌が産生する。OMVsは細胞から不要物を排出する機構と考えられてきたが、近年になって微生物細胞間で物質輸送を行う点で、注目を集めている。

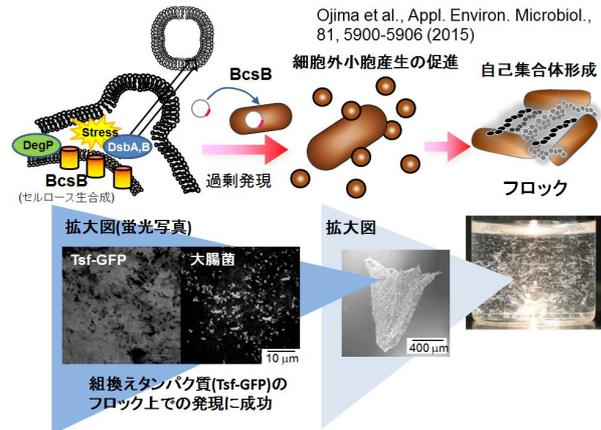


図1 大腸菌の細胞外小胞産生と自発型フロック形成誘導

2. 研究の目的

大腸菌フロックは、細胞内膜上のタンパク質である *BcsB* の過剰発現によって細胞膜ストレスが誘引され、その結果として促進された細胞外小胞の産生が形成のトリガーとなっていることを明らかにしている。またフロック構造体は、プロテアーゼ感受性で全フロック重量の約60%がタンパク質で構成されている。タンパク質量分析の結果、OMVs由来と考えられる細胞外膜タンパク質 *OmpA* や *OmpC* に加えて、タンパク質合成における伸長因子である *Tsf* タンパク質が非常に高い割合で発現していることが確認されている。さらに、最新の研究結果において、図1に示すように、*Tsf* タンパク質と融合させることで、フロック構造体表面に GFP をフロック全タンパク質重量の10%程度の割合で固相分泌発現できることを明らかにしている。

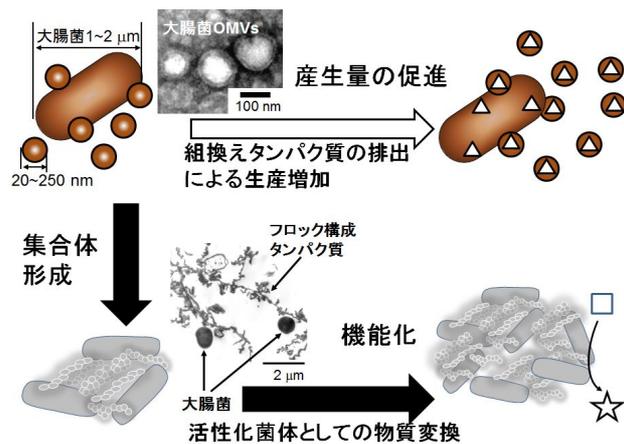


図2 外膜小胞によるタンパク質分泌生産と自己集合体形成制御に基づく有害物分解反応への応用

以上の先行的研究成果を踏まえ、本研究では以下の項目について、検討を行った(図2)。

- (1)細胞外小胞産生促進を利用した組換えタンパク質の分泌生産プロセスの構築
- (2)フロックの組換えタンパク質修飾による機能化と有害物分解反応への応用

3. 研究の方法

(1)細胞外小胞産生促進を利用した組換えタンパク質の分泌生産プロセスの構築

大腸菌の OMVs 産生量を増加させるため、*nlpI* 遺伝子をはじめ欠損させることにより OMVs 産生量が向上する細胞表面関連遺伝子を複数選択し、P1 ファージを用いた形質導入法による二重欠損株を作製した。具体的には、*nlpI* に加えペリプラズムプロテアーゼをコードし欠損することでペリプラズムに不要タンパク質が蓄積する *degP*、外膜脂質の外層と内層の非対称性を高める *miaE* の欠損株、同じく膜関連遺伝子である *miaA* の欠損を組み合わせた。OMV 産生量の評価は、下記の手順で行った。大腸菌を LB 培地 100 ml で培養した培養液に対して、遠心分離と孔径 0.45 μm のフィルター処理により、菌体を完全に取り除いた。得られた培養上清に濃度が 400 g/L となるように硫酸アンモニウムを添加して塩析させ、遠心分離により外膜小胞を濃縮した。さらに、超遠心分離(109,000 g, 1 時間, 4)により外膜小胞を回収した。OMV 産生量の定量評価に関しては、SDS-PAGE で分析した際に、37 kDa 付近に現れる OmpC, F, A のバンドの濃淡により評価する方法を採用した。

インターフェロン(IFN)などのヒト由来タンパク質は現在、遺伝子組換え大腸菌を用いて工業生産されている。大腸菌を用いたこれら異種タンパク質の発現には封入体を形成するといった問題点があるため、前述のように活性化を誘発するペリプラズム空間で発現させる手法をとることがある。しかし、ペリプラズムへと移行した異種タンパク質は菌体外へと排出できずに蓄積してしまうため、結果的に生産が抑制される。そこで本研究では大腸菌の外膜小胞(OMVs)を利用した、ヒトインターフェロン $\alpha 2\text{b}$ (IFN $\alpha 2\text{b}$)の分泌生産プロセスの構築を試みた。具体的には、大腸菌細胞の外膜と内膜の間の空間であるペリプラズムへ移行するための外膜タンパク質 OmpW との融合発現を行う IFN $\alpha 2\text{b}$ 発現用ベクターを作製し、フラスコを用いた液体培養によって大腸菌の IFN $\alpha 2\text{b}$ 生産を行った。得られた OMV 産生量は上記の方法で評価し、IFN $\alpha 2\text{b}$ 量はウエスタンブロッティングにより定量評価を行った。

(2)フロックの組換えタンパク質修飾による機能化と有害物分解反応への応用

有機リン系農薬であるパラチオンの中間分解物であるパラオキソンは、強力なアセチルコリンエステラーゼ阻害剤として働き、毒性が強い。パラオキシソンの分解酵素として知られる phosphotriesterase (PTE)と Tsf の融合タンパク質を大腸菌フロック表面に修飾し、パラオキソン分解効率を試験した。フロック表面に PTE を固相分泌発現することにより、フロック中に存在する大腸菌の菌体内に発現させた場合と比較して、基質との接触頻度が改善することで、分解効率が向上すると期待した。文献報告の多い *Brevundimonas diminuta* の PTE を人工遺伝子合成により作製し、大腸菌プラスミドにクローニングを行った。比較のため、PTE のみを菌体内に発現するプラスミドと、Tsf と PTE の融合タンパク質をフロック表面に発現するプラスミドを準備した。各プラスミドをフロック形成大腸菌に導入し、グルコース含有 LB 培地で 37 , 一晚培養し、フロックを形成させた。得られた大腸菌フロックについて、BCA 法によりタンパク質量を測定することでフロック形成量を評価した。単位フロック量あたりの PTE 発現量はウエスタンブロッティングにより、パラオキシソンの分解率は 405 nm の吸光度を測定することで定量的に評価した。

4. 研究成果

(1)細胞外小胞産生促進を利用した組換えタンパク質の分泌生産プロセスの構築

図 3A に示すように OMVs 量は、ペプチドグリカン層の構造維持に關与する *nlpI* 遺伝子と外膜脂質の外層と、内層の非対称性を高める *yrbE* 遺伝子を欠損させた二重欠損株が最も高く、野生株(WT)の約 30 倍となり、単独欠損株と比べても大幅に増加した。また産生量が多かった二重欠損株の培養液より回収した OMVs をネガティブ染色により透過型電子顕微鏡で撮影した画像を図 3B に示す。顕微鏡画像から、二重欠損株においても球形のベシクル様構造のナノ粒子が確認されたことから、OMVs が産生していることが裏付けられた。これらの研究成果に関しては、国内学会において成果発表を行った。

続いて、WT 株や二重欠損株 ($\Delta nlpI \Delta yrbE$)に IFN を発現させ、回収した OMVs の産生量や含まれる IFN 産生量を評価した結果を図 4 に示す。

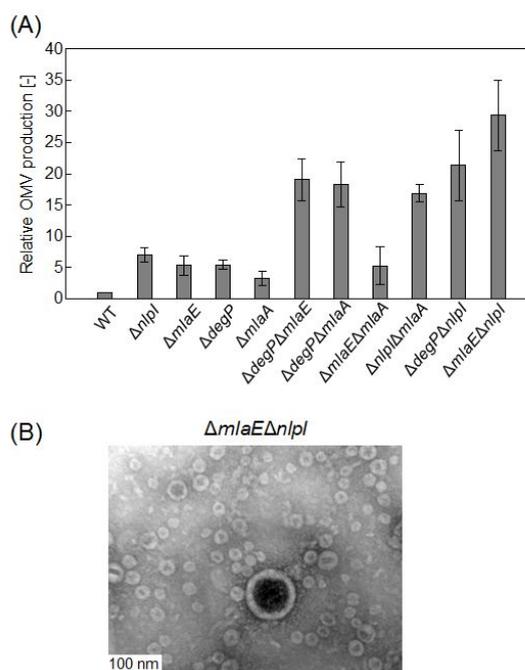


図 3 各単独・二重欠損株の OMVs 産生量の相対比較(A)と TEM による観察画像

IFN を発現させていない場合と比べて OMVs 産生量の比は少し小さくなったものの、WT と比較して二重欠損株は約 15 倍程度の OMVs 産生量を示した。さらに、これら OMVs 産生量の異なる大腸菌株の IFN 分泌産生量をウエスタンブロットングで評価したところ、WT では培養上清に分泌された IFN 量は検出感度以下であったが、*nlpI* 欠損株では約 3 $\mu\text{g/L}$ 、二重欠損株では約 20 $\mu\text{g/L}$ の濃度であることが確認された。さらに超音波破碎で OMV を破碎し回収した IFN は水溶性であったため、正しくフォールディングされていると推測される。なお、モデルタンパク質である GFP を発現させた場合は、OMV を介して約 3 mg/L の濃度で分泌した。以上より、OMVs 産生量の増加に伴う IFN の細胞外分泌が確認でき、新たなタンパク質分泌ツールとしての可能性を実証できた。

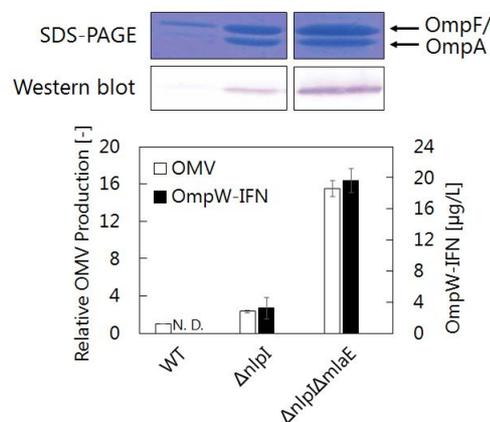


図 4 各大腸菌株による OMVs 産生量と IFN 産生量の比較。

(2) フロックの組換えタンパク質修飾による機能化と有害物分解反応への応用

図 5 に示すようにどちらのプラスミドを導入した大腸菌もフロック形成能を維持しており、得られたフロックのサイズや形状にも大きな違いは確認されなかった。またタンパク質量基準で定量評価を行ったフロック形成量にも差がないことがわかった(データ省略)。

続いて、回収されたフロックについて、ウエスタンブロットングにより PTE の発現を確認したところ、PTE のみを菌体内に発現した場合、Tsf との融合発現を行った場合の両方で目的タンパク質の発現を確認した(図 6A)。さらに蛍光標識された抗 His-tag 抗体により、各フロックを染色したところ、Tsf-PTE タンパク質は、フロック上に固相分泌発現していることが確認された(データ省略)。これらの結果を受けて、分解反応としてパラオキソン 10 μM に対して、精製したフロックをタンパク質量換算で 67 $\mu\text{g/mL}$ 加え、25 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させた。反応後にフロックを遠心分離で取り除き上清の吸光度を測定したところ、PTE を菌体内に発現させたフロックでは約 90% のパラオキソンが分解されていた(図 6B)。一方で、PTE を発現させていないフロックでは、ほとんど分解は確認されなかった。この結果から、大腸菌に遺伝子導入した PTE は活性を保持していることが示された。最後に、Tsf と融合によりフロック上に固相分泌発現した Tsf-PTE に関しては、同じフロック量あたりで約 20% の分解率にとどまった(図 6B)。各組換えタンパク質の発現量には大きな差異がないにも関わらず、期待した分解効率の向上は確認できず、菌体内に PTE を発現させた場合の方が分解効率は良いという結果となった。

考察として、Tsf との融合タンパク質の大部分は、活性を失った状態でフロック上に発現していることが考えられた。今後は、PTE の活性を保った状態で融合タンパク質を発現させる必要がある。具体的には、これまでは制限酵素サイト等に由来するランダム配列がリンカーとして挿入されていたが、物理的構造として柔軟性の高い配列、低い配列などが酵素活性の維持に寄与することが報告されている。そこで、リンカー配列を変更し融合発現させた際の PTE 活性について確認し、フロック表面上への分泌発現がパラオキソン分解効率の向上に繋がるか、検討する予定である。

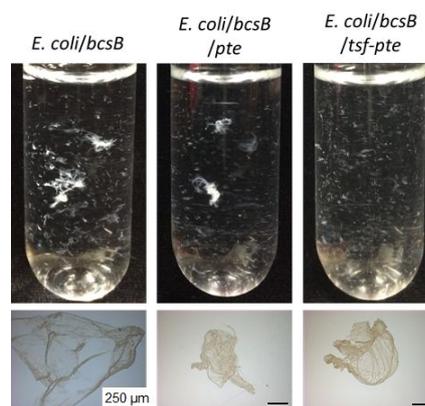


図 5 各大腸菌株によって形成されたフロックの写真

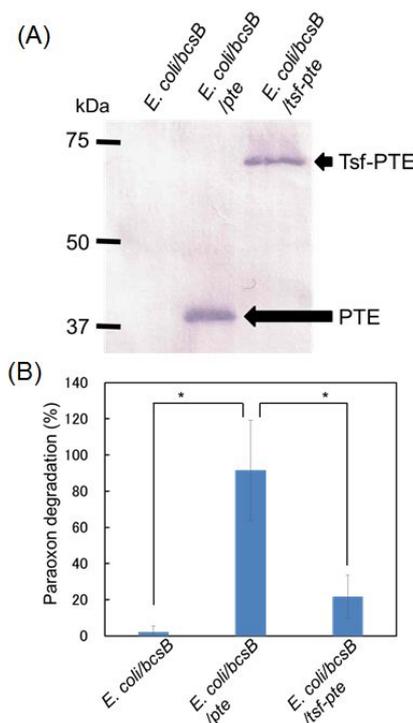


図 6 各フロックの PTE 発現に対するウエスタンブロットング結果(A)とパラオキシソンの分解率(B)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Y. Ojima, M. Azuma, M. Taya, “Inducing flocculation of non-floc-forming *Escherichia coli* cells (Review)”, World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol.34, 185, December 2018

F. M. Kashiwagi, Y. Ojima, M. Taya, “Metabolic Engineering of *Escherichia coli* KO11 with NADH regeneration system for enhancing ethanol production”, Journal of Chemical Engineering of Japan, vol.51, no.3, pp.264-268, March 2018

Y. Ojima, K. Yamaguchi, M. Taya, “Quantitative evaluation of recombinant protein packaged into outer membrane vesicles of *Escherichia coli* cells”, Biotechnology Progress, vol.34, no.1, pp.51-57, February 2018

Y. Ojima, S. Nunogami, M. Azuma, M. Taya, “Displaying a recombinant protein on flocs self-produced by *Escherichia coli* through fused expression with elongation factor Ts”, Enzyme and Microbial Technology, vol.108, pp.21-25, January 2018

〔学会発表〕(計 9 件)

尾島 由紘, 本間 裕章, 大塚 未音, 東 雅之「共培養による大腸菌フロック内への酵母の取込み」化学工学会第 84 年会, G308, 東京, 2019 年 3 月 (口頭発表)

尾島 由紘, 東 雅之「微生物の外膜小胞の分泌と凝集体形成の関連性」膜シンポジウム 2018, 205, 神戸, 2018 年 11 月 (口頭発表)

児波 克哉*, 澤邊 朋美, 尾島 由紘, 東 雅之「大腸菌外膜小胞を介した IFN の分泌生産」膜シンポジウム 2018, 205, 神戸, 2018 年 11 月 (ポスター発表)

澤邊 朋美, 児波 克哉, 尾島 由紘, 東 雅之「大腸菌の細胞表層改変による外膜小胞大量分泌株の構築」日本生物工学会大会平成 30 年度大会, 1Cp04, 大阪, 2018 年 9 月 (口頭発表)

本間 裕章, 大塚 未音, 尾島 由紘, 東 雅之「培地成分が大腸菌フロック形成に与える影響」日本生物工学会大会平成 30 年度大会, 3Fa09, 大阪, 2018 年 9 月 (口頭発表)

Y. Ojima, K. Konami, M. Azuma, “Development of secretory protein expression system focusing on outer membrane vesicles of *Escherichia coli*”, The 23rd Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC2017), Xi'an, China, October 2017 Poster award 受賞

尾島 由紘, 東 雅之「微生物の外膜小胞に着目したバイオプロセスの革新」化学工学会第 49 回秋季大会, V309, 名古屋, 2017 年 9 月 (ポスター発表)

児波 克哉, 尾島 由紘, 東 雅之「大腸菌の外膜小胞を介したタンパク質分泌発現系の構築」化学工学会第 49 回秋季大会, PB233, 名古屋, 2017 年 9 月 (ポスター発表)

大塚 未音, 尾島 由紘, 東 雅之「大腸菌の自発的なフロック形成と有害物分解への応用」日本生物工学会大会平成 29 年度大会, 3P-I133, 東京, 2017 年 9 月 (ポスター発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioa.eng.osaka-cu.ac.jp/bie/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。