

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15160

研究課題名(和文)細菌のメンブレンベシクル取り込みメカニズムの究明 ベシクルから何を読み取るのか

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of bacterial membrane vesicle uptake

研究代表者

平山 悟 (Hirayama, Satoru)

国立感染症研究所・細菌第一部・研究員

研究者番号：70778555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細菌がメンブレンベシクル(MV)を取り込むメカニズムについて詳しくすることを目的に、大腸菌の遺伝子欠損株を用いたスクリーニングを行ったところ、欠損することでMV取り込み能が増大する可能性のある複数の遺伝子を見出すことができた。一方、効率的な研究の進行を目的に、大腸菌のMV形成量が増大する条件を検討したところ、培養時にグリシンを添加する方法を見出した。1.0%グリシンの添加により、MV収量はタンパク質量として約70倍、脂質量として約50倍となった。グリシン誘導MVはタンパク質量あたりのエンドトキシン活性が約1/8に減少していたが、非誘導MVと同等の免疫誘導活性を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌のメンブレンベシクル(MV)は、細菌間コミュニケーションツールとしての機能が注目されつつある。本研究で見出されたMV取り込みに関与する可能性のある遺伝子について、今後さらなる解析を行うことにより、MVを介した細菌間クロストークの包括的理解が促進され、ひいては細菌の病原性発現や薬剤耐性の蔓延のような感染症のキーファクターのコントロールに展開できることが期待される。また、グリシンによる大腸菌MV産生増大法は、MV取り込みメカニズム研究の進展に役立てられるだけでなく、アジュバントやワクチン開発等、幅広い分野への応用展開をも期待することができる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of bacterial membrane vesicle (MV) uptake, screening was performed using a gene knockout collection of Escherichia coli, and multiple genes were found as candidates that could increase MV uptake when deleted. On the other hand, in order to proceed the experiment efficiently, the conditions for increasing the amount of MV formation in E. coli were examined, and the addition of glycine during the culture was effective. The amount of MV was increased approximately 70-fold (as protein amount) or 50-fold (as lipid amount) by the addition of 1.0% glycine. Although glycine-induced MVs had an endotoxin activity per protein amount reduced to approximately 1/8, they had an immune-inducing activity equivalent to that of non-induced MVs.

研究分野：細菌学

キーワード：メンブレンベシクル 細胞間コミュニケーション 形質転換 グリシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メンブレンベシクル (MV) は、菌種により相違はあるが 20~400 nm ほどの膜小胞であり、グラム陰性・陽性問わずあらゆる細菌が産生する。MV は、細胞膜由来のリン脂質や膜タンパク質、LPS (lipopolysaccharide) 等で構成されるほか、核酸、酵素等の様々な物質を含有しており、構造安定性も高いことから、多面的な機能を有する。

MV は細菌の細胞間クロストークにも重要な役割を有することが注目されつつある。例えば *Pseudomonas aeruginosa* においては、quorum sensing (QS) のシグナル因子が MV に搭載され運搬されることが示されている [Mashburn *et al.*, Nature 2005]。また、腸管出血性大腸菌 *E. coli* O157:H7 の MV に含まれる DNA が細菌間で受け渡され、効率的に遺伝子水平伝播・遺伝子組換えが行われることも報告されている [Kolling *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 1999]。

上述の *P. aeruginosa* における QS の例に限ると、MV 上にシグナル分子が結合していれば細菌間でセンシングすることができ、必ずしもレシピエントは MV を細胞内に取り込む必要はないと考えられる。一方で、細菌の MV の中にプラスミド DNA が内包され、それを受け取った細菌が形質転換されることが報告されている [Tran *et al.*, Sci. Rep. 2017]。このような遺伝子水平伝播は細胞表面の構造が異なる異菌種に対しても起こるため、MV の取り込みは単純な membrane fusion では説明し切れない。このようなことを考慮すると、細菌には MV を取り込むメカニズムや、取り込みを制御するシステムが存在することが強く示唆される。

2. 研究の目的

細菌が産生する MV は、細菌間でシグナル分子や DNA 等を受け渡すための新たなベクターとしての機能が注目されつつある。本研究では、細菌が MV を取り込むメカニズムや、MV を取り込んだ細胞の応答について明らかにすることを目的とした。

本研究によって得られる研究成果を通じて、MV を介した細菌間クロストークの包括的理解が促進され、ひいては細菌の病原性発現や薬剤耐性の蔓延のような感染症のキーファクターのコントロールに展開できることが期待された。

3. 研究の方法

(1) MV 取り込みメカニズムに関する検討

プラスミドを含有する MV の構築

MV 画分への鞭毛の混入を防ぐため、大腸菌の鞭毛欠損株 (BW25113 *flhD* 株) を用いた。抗生物質耐性遺伝子を有するプラスミドでこの株を形質転換し、形質転換体の培養上清から MV を調製することで、プラスミドを含有する MV を作出した。MV の調製は、培養上清をフィルトレーション後、超遠心分離することによって行った。MV に含まれるプラスミドのコピー数をリアルタイム PCR で測定した。

MV の取り込みが促進される株のスクリーニング

E. coli の遺伝子欠損株ライブラリーを用いて、MV の取り込みが促進される株をスクリーニングし、MV の取り込みに関与する遺伝子の同定を試みた。抗生物質耐性遺伝子を有するプラスミドが含まれた MV を *E. coli* 遺伝子欠損株に添加して、MV の取り込みを通じて抗生物質耐性が付与される株をスクリーニングした。遺伝子の欠損部位の同定は arbitrarily primed PCR によって行った。

(2) 大腸菌 MV 産生の誘導に関する検討

大腸菌の培養上清より調製する MV は、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 等に比較してその収量が小さい。実験の効率化を図るため、大腸菌の MV 産生が増大する条件を検討した。また、産生が誘導された MV と、非誘導 MV との特性比較を行った。今後の応用展開を見据え、プロバイオティクスとして用いられる *E. coli* Nissle 1917 (EcN) 株を供試菌株とした。MV 画分への鞭毛の混入を防ぐため、鞭毛欠損株 (EcN *flhD* 株) を Datsenko and Wanner の方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000] を用いて作製した。MV のタンパク質量測定は Bradford 法で行い、脂質量測定はリノール酸を標準物質として蛍光色素 FM4-64 を用いて測定した。エンドトキシン活性はエンドスペシー ES-50M セット (生化学工業株式会社) を用いて測定した。MV に含まれるタンパク質について、SDS-PAGE やウエスタンブロットによって解析した。また、マウスマクロファージ様細胞 J774.1 におけるサイトカイン発現をリアルタイム PCR 及びサイトカイン ELISA によって解析した。さらに、マウス経鼻ワクチンモデルを用いて、オボアルブミン (OVA) とともに MV や他のアジュバントをマウスに接種し、OVA に対する特異的抗体産生を ELISA によって評価した。

4. 研究成果

(1) MV 取り込みメカニズムに関する検討

抗生物質耐性遺伝子を有するプラスミドで大腸菌 (BW25113 *flhD* 株) を形質転換し、その株の培養上清より MV を調製した。リアルタイム PCR の結果から、MV 1 µg (タンパク質量) あたりにおよそ 1×10^{11} コピーのプラスミドが含まれていることが明らかになった。

まず、大腸菌の野生株を供試菌株として、MV を介した形質転換が生じることを確認した。上

述のプラスミドを含む MV を大腸菌野生株の培養液に添加しインキュベート後、抗生物質を含む培地に塗布することで、抗生物質耐性を発現した数個のコロニーが得られた。これら形質転換体からは、当該プラスミドを抽出することができた。これらのことから、MV の取り込みを通して大腸菌の形質転換が生じたことが強く示唆された。

次に、どのような遺伝子が MV の取り込みに関与するのかを明らかにするため、大腸菌の遺伝子欠損株ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。大腸菌遺伝子欠損株をおよそ 100 株ずつ混合し、その懸濁液に MV を添加してインキュベート後、得られた形質転換体について欠損遺伝子を同定した。3,909 の遺伝子欠損株について検討した結果、MV の取り込み能が増大する可能性のある複数の候補株を見出すことができた。

今後、これらの遺伝子がどのようにして MV の取り込みに関与するのかを解析することで、MV 取り込みメカニズム解明に向けた研究の発展が期待できる。

(2) 大腸菌 MV 産生の誘導に関する検討

MV を用いた研究を効率的に進行させるため、大腸菌の MV 産生量が増大する培養条件を検討した。EcN *flhD* 株の培養時にグリシンを添加することで、顕著な MV 産生量の増大が認められた。MV 収量は 1.0~1.2% のグリシン添加で最大となった。1.0% グリシン添加条件では、未添加条件に比較して、同量の培養上清あたりの MV 収量がタンパク質量として約 70 倍、脂質量として約 50 倍となった。グリシン誘導 MV は、非誘導 MV に比較してサイズ（粒径）の増大が認められるとともに、タンパク質組成に変化が生じており、細胞質タンパク質及び内膜タンパク質の割合が増大していることが示された。これらのことから、グリシン誘導 MV は、非誘導 MV とは産生メカニズムに相違があることが考えられた。また、グリシン誘導 MV では、タンパク質量あたりのエンドトキシン活性が約 1/8 に減少した。一方で、グリシンによる誘導の有無に関わらず、MV は、マウスマクロファージ様細胞 J774.1 の IL-6、IL-12 及び TNF- α 産生を添加量依存的に誘導し、OVA を抗原に用いたマウス経鼻ワクチンモデルにおいては、コレラトキシン B や Poly (I:C) と同等かそれ以上に強力な粘膜アジュバント活性を示した。

以上から、グリシンによって大腸菌 MV 産生を顕著に誘導することに成功した。さらに、この方法で誘導された EcN MV が有する上記の利点を活用して、安全で効果的なアジュバントやワクチン開発等、幅広い分野への応用展開をも期待することができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satoru Hirayama, Ryoma Nakao	4. 巻 -
2. 論文標題 Glycine significantly enhances bacterial membrane vesicle production: a powerful approach for isolation of LPS reduced membrane vesicles of probiotic Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbial Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1751-7915.13572	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平山悟, 中尾龍馬
2. 発表標題 グリシンによる大腸菌メンブレンベシクル産生の誘導とその特性解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoru Hirayama, Ryoma Nakao
2. 発表標題 Glycine strongly enhances immunoactive membrane vesicle production from flagella-deficient E. coli
3. 学会等名 12th Vaccine Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 メンブレンヴェシクルの産生増大方法	発明者 平山悟, 中尾龍馬	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-216664	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中尾 龍馬 (Nakao Ryoma)		