

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19168

研究課題名（和文）膜小胞の融合を利用した遺伝子デリバリー系構築

研究課題名（英文）Gene delivery system among bacterial cells by membrane vehicle

研究代表者

野尻 秀昭（Nojiri, Hideaki）

東京大学・生物生産工学研究センター・教授

研究者番号：90272468

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、ペプチドグリカン不全により膜小胞の形成を誘発させると、膜小胞内にはプラスミドDNAの封入効率が向上することが示された。特にグリシン添加は膜小胞形成を格段に増加させるだけでなく、膜小胞内のプラスミドコピー数が増加した。グリシン添加は細胞膜損傷を引き起こしており、プラスミドDNAの漏出や外膜-内膜小胞形成が膜小胞のDNA封入に関与していると考えられた。さらにグリシン誘導による膜小胞は他の多くの細菌と結合能を有することが示された。以上の結果から、本研究では膜小胞内へのDNA封入メカニズムの一端を明らかにし、膜小胞の情報伝達ツールとしての開発に大きく貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜小胞は、全ての微生物が分泌するとされる直径20-200 nmの細胞外小胞で、内部にはDNA、タンパク質、情報伝達物質などが包含されている。他細胞の細胞膜に融合することから遺伝子を含む情報伝達ツールとして実際に機能しており、この自然のメカニズムを利用した遺伝子組換えツールの開発が期待されている。しかし、融合過程についての基礎的な研究が不足しており、ツール開発にはほど遠い状況である。本研究は、特に膜小胞の生成と他細胞への融合について新知見を与えるものであり、今後の新規遺伝情報伝達ツールの開発に大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The present study showed that peptidoglycan deficiency induced membrane vesicle (MV) formation, and that plasmid DNA amounts contained in the resultant MVs were increased. In particular, exposure to glycine not only markedly increased MV formation, but also increased the plasmid copy number within the MVs. Glycine treatment caused cell membrane damage, and it was considered that the leakage of plasmid DNA and the formation of outer membrane-inner membrane vesicles are involved in the DNA encapsulation in MVs. Furthermore, it was shown that the glycine induced MVs were capable of binding to various types of bacteria. From the above results, a part of the mechanisms of DNA encapsulation in MVs was clarified, and it will contribute greatly to the development MV-based gene transfer tools.

研究分野：環境微生物学

キーワード：膜小胞 遺伝子の水平伝播 遺伝子組換え

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜小胞(Membrane vesicles)は、全ての微生物が分泌するとされる直径 20-200 nm の細胞外小胞で、内部には DNA、タンパク質、情報伝達物質などが含まれている。他の微生物細胞の細胞膜に融合することから、遺伝子を含む情報伝達ツールとして実際に機能しているが、融合過程についての基礎的な研究が不足しており遺伝子組換えツールとしての開発にはほど遠い状況である。

2. 研究の目的

本研究では、モデル細菌を用いて膜小胞への DNA 封入や細菌への融合能を評価し、膜小胞の遺伝子伝播に関する基礎的なデータを蓄積する。また、ベクターに載せた外来遺伝子の導入・発現や破壊用遺伝子カセットを用いた遺伝子破壊等が可能かを、頻度を含めて評価する。これらを通して、好気・嫌気両条件下での遺伝子組換えツールとしてのポテンシャルを評価する。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株と培養方法

大腸菌 *Escherichia coli* BW25113 株とその変異株 ($\Delta nlpI$, $\Delta rseA$, $\Delta toIA$) を用いて実験を行った。培養には LB 培地を用いた。膜小胞内へのプラスミド封入は pUC19 を用いて検討した。また、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を保持した膜小胞作製には、pCA24N に目的遺伝子が挿入されたプラスミドを用いた。

(2) 膜小胞抽出と定量方法

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、硫酸アンモニウム沈殿によりタンパク質を濃縮した。緩衝液に懸濁した後、超遠心することにより膜小胞を回収した。膜小胞の定量には、脂質二重膜染色試薬 FM4-64 を用いた。また、膜小胞の個数計測にはナノ粒子トラッキング解析を用いた。

(3) DNA の定量

培養上清中の DNA 濃度は PicoGreen を用いて定量した。また、膜小胞外部の DNA を DNase により分解し、その内部のプラスミド濃度をリアルタイム PCR により定量した。

(4) 透過電子顕微鏡観察

膜小胞はモリブデン酸によりネガティブ染色した後、透過型電子顕微鏡により観察した。また細菌の膜小胞形成は、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により観察した。

(5) 膜小胞の細菌との相互作用解析

GFP を含有する膜小胞の形成には pCA24N 系プラスミドを保持する大腸菌株を使用した。細菌と膜小胞との相互作用解析にはフローサイトメトリーを使用した。

4. 研究成果

(1) 膜小胞過剰形成株における膜小胞への DNA 封入

これまでに、大腸菌では $\Delta nlpI$, $\Delta rseA$, $\Delta toIA$ の変異株で膜小胞形成量が向上することが明らかとなっている¹。そこで野生株と変異株にプラスミド pUC19 を導入し、各変異株で形成される膜小胞と細胞外 DNA の放出との関係を解析した。細胞外 DNA 量を測定したところ、野生株に比べて $\Delta nlpI$ 株で細胞外 DNA の増加がみられ、膜小胞を除去するとその濃度は半減した。そこで各培養液から膜小胞を抽出し、その内部に存在するプラスミド濃度を定量的 PCR により測定した。その結果、 $\Delta nlpI$ 株由来の膜小胞におけるプラスミドコピー数は他の膜小胞に比べて増加していた(図 1)。一方、細菌のプラスミドコピー数には顕著な差異は見られなかったことから、 $\Delta nlpI$ 株では膜小胞内への DNA が効率封入されることが示された。

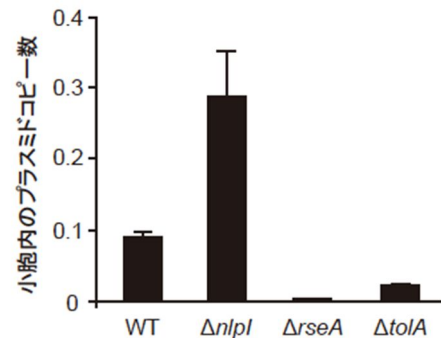


図 1 大腸菌野生株および変異株由来の膜小胞内におけるプラスミドコピー数

(2) ペプチドグリカン欠陥による膜小胞への DNA 移行

$\Delta nlpI$ 株ではペプチドグリカン分解が進み膜小胞形成量が向上することが報告されている²。一方、グリシン存在下ではペプチドグリカン合成が阻害されるだけでなく³、膜小胞形成が促進することが近年明らかとなっている⁴。そこでグリシン添加により、プラスミド封入膜小胞の形成量を増加させることが可能かを検証した。1%グリシン存在により、膜小胞形成は 30 倍以上に増加した。また、培養上清中の DNA 濃度を測定したところ、菌体あたりの細胞外 DNA 量もグリシン添加により増加した。さらに、膜小胞を抽出して膜小胞内外の DNA 量を算出したところ、グリシン添加により膜小胞内部の DNA 比率が高まることが示された。膜小胞内部のプラスミド濃度を定量的 PCR により測定したところ、グリシン添加によりプラスミドコピー数が顕著に増加し

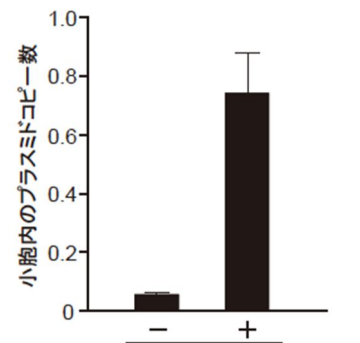


図 2. グリシン添加による膜小胞内プラスミドコピー数の変化

た(図2)。

(3) グリシンによる細胞膜損傷

グリシン添加によりプラスミド含有膜小胞の形成が向上した要因を明らかにするために、グリシン添加による生育の影響を評価した。その結果、定常期初期あたりから濁度の低下が観察された。定常期における細菌を位相差顕微鏡で観察したところ、グリシンを添加した場合には溶菌が起こっていた。そこで対数増殖期における細菌の生死を LIVE/DEAD で解析したところ、30% 近くは死菌あるいは細胞膜損傷を起こしていることが示された。

(4) グリシン存在下における膜小胞形成観察

形成された膜小胞を透過型電子顕微鏡により観察したところ、グリシンを添加した培養液から抽出した膜小胞サンプル内では、リン脂質二重層である細胞膜が二重となっている膜小胞が観察された(図3)。さらに膜小胞形成過程を急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により解析したところ、内膜および細胞質成分を含んだ外膜-内膜小胞(Outer-inner membrane vesicles)を形成している様子がグリシン添加系で観察された(図4)。以上の結果から、グリシンを添加することで細胞膜の損傷が起こり、細胞内の DNA の漏出や外膜-内膜小胞の形成によってプラスミド DNA が膜小胞内に封入されると考えられた。

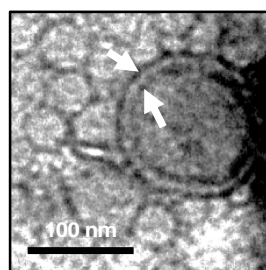


図3. グリシン添加系における二重膜小胞の透過電子顕微鏡観察(矢印は細胞膜を示す)

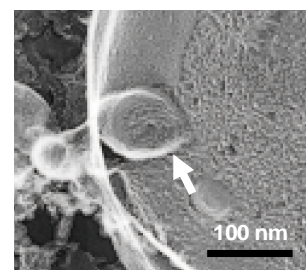


図4. グリシン添加系における膜小胞形成の急速凍結レプリカ電子顕微鏡観察(矢印は外膜-内膜小胞の形成を示す)

(5) グリシン存在下による膜小胞の細菌との相互作用

グリシン存在下で大腸菌から形成された膜小胞が情報伝達ツールとして機能するかを検証するために、GFP 含有膜小胞を形成させた。外膜タンパク質 OmpW との融合タンパク質として発現させるだけでなく、細胞質タンパク LacA との融合タンパク質であってもグリシン誘導膜小胞に含まれることが示された。また、LacA-GFP を含有する大腸菌膜小胞を多種多様なモデル細菌と反応させ、膜小胞と細菌との相互作用をフローサイトメトリーで解析した。その結果、多くの細菌に GFP 含有膜小胞が結合することが示され、グリシン誘導膜小胞における遺伝子送達媒体としてのポテンシャルが示唆された。

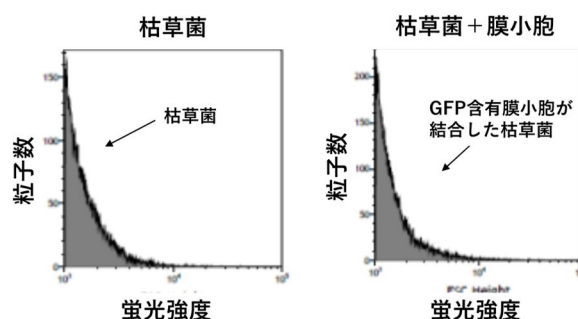


図5. LacA-GFP を含有する大腸菌膜小胞と枯草菌との相互作用

(6) 総括

本研究により、ペプチドグリカン不全により膜小胞の形成を誘発させると、膜小胞内にはプラスミド DNA の封入効率が向上することが示された。特にグリシン添加は膜小胞形成を格段に増加させるだけでなく、膜小胞内のプラスミドコピー数が増加した。グリシン添加は細胞膜損傷を引き起こしており、プラスミド DNA の漏出や外膜-内膜小胞形成が膜小胞の DNA 封入に関与していると考えられた。さらにグリシン誘導による膜小胞は他の細菌細胞との結合能を有することが示された。以上の結果から、本研究では膜小胞内への DNA 封入メカニズムの一端を明らかにし、膜小胞の情報伝達ツールとしての開発に大きく貢献した。

<引用文献>

1. McBroom AJ *et al.* Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J Bacteriol.* 188:5385-5392 (2006) DOI: 10.1128/JB.00498-06
2. Schwechheimer C *et al.* NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen.* 4: 375-389 (2015) DOI: 10.1002/mbo3.244
3. Hammes W *et al.* Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J Bacteriol.* 116:1029-1053 (1973)
4. Hirayama S & Nakao R. Glycine significantly enhances bacterial membrane vesicle production: a powerful approach for isolation of LPS-reduced membrane vesicles of probiotic *Escherichia coli*. *Microbiol Biotechnol. in press* DOI: 10.1111/1751-7915.13572

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Tashiro Yosuke, Takaki Kotaro, Futamata Hiroyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Targeted delivery using membrane vesicles in prokaryotes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 114 ~ 120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.16.0_114	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 -

1. 著者名 Tashiro Yosuke	4. 巻 44
2. 論文標題 Vesicle Formation by Microbes: Approach from Microbiology to Membrane Science	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MEMBRANE	6. 最初と最後の頁 96 ~ 100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5360/membrane.44.96	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 ナノ構造の可視化で切り拓く細菌膜小胞の特性と形成機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野想、塩田拓也、三浦わかな、二又裕之、田代陽介
2. 発表標題 緑膿菌膜小胞形成部位に局在するカルジオリピンの合成機構及び生理機能
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中道菜緒、二又裕之、田代 陽介
2. 発表標題 膜小胞過剰分泌性Buttiauxella属細菌における小胞分泌機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 環境変化に应答する細菌の膜脂質変動と膜小胞分泌
3. 学会等名 日本細菌学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 微生物由来の膜小胞が魅せる多彩な機能
3. 学会等名 油化学会東海支部講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Tashiro, Takuya Shiota, Minato Takahara, Masaki Shintani, Hiroyuki Futamata, Kazuhide Kimbara
2. 発表標題 Outer membrane vesicle formation by Pseudomonas aeruginosa biofilm cells
3. 学会等名 Eurobiofilms 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 細菌の膜小胞形成観察に寄与するテクノロジー
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	田代 陽介 (Tashi ro Yosuke) (30589528)	静岡大学・工学部・講師 (13801)	