

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670025

研究課題名(和文) 遺伝子組み換え常在細菌を利用した動物に対する成長ホルモン供給法の確立

研究課題名(英文) Utilization of indigenous bacteria to produce recombinant proteins in animal body

研究代表者

垣内 力 (KAITO, CHIKARA)

東京大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60420238

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)：本研究では、昆虫の腸管に常在する細菌種の同定と遺伝子組み換え後の再定着能の検討を行った。クワガタムシの菌嚢とフタホシコオロギの腸管から、複数種の細菌を分離同定した。コオロギから分離した常在細菌について、プラスミド形質転換後の再定着が可能であった。また本研究は、昆虫の体サイズを増加させる生理活性物質の探索を行った。ロイヤルゼリーの経口投与により、カイコガとフタホシコオロギの体サイズの増加が認められた。以上の結果は、昆虫の腸管に常在する細菌の機能改変と再定着が可能であること、ならびに、昆虫の体サイズを増加させる物質がロイヤルゼリー中に存在していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：This study identified bacterial species that exist in insect guts and examined its activity of genetic transformation and reattachment to insect guts. We isolated several bacterial species from stag beetles and the two-spotted cricket. We found that one of the bacterial species could be transformed with plasmid DNA and reattached to cricket gut. In addition, this study searched biological molecules that increase insect body size. We found that administration of royal jelly to silkworms or crickets increases their body sizes. The result suggests that biological molecules in royal jelly have an activity to increase insect body size.

研究分野：微生物学

キーワード：ロイヤルゼリー 常在細菌 フタホシコオロギ カイコ

1. 研究開始当初の背景

タンパク質製剤の生産には、そのタンパク質を含有する生物材料を大量に必要とする。また、タンパク質製剤は消化・分解されるため、経口投与できず、長期の注射や経皮投与を必要とする。

遺伝子治療では、患者の体細胞の染色体に必要な遺伝子を挿入し、必要なタンパク質を発現させる。ウイルスベクターを利用して、染色体への遺伝子の挿入効率は低く、副作用もある。

これらの問題点を克服するために、常在細菌を用いてタンパク質をヒトの体に送り届ける方法を着想した。

2. 研究の目的

動物の体には、様々な常在細菌が存在し、動物と様々な物質のやりとりをしている。本研究では、動物から分離した常在細菌に成長ホルモン遺伝子を組み込み、動物に再定着させて、成長ホルモンを持続的に動物体内に供給させる方法の確立を目指す。本研究は、新しい成長ホルモン供給法の確立に貢献するだけでなく、常在細菌の遺伝子組み換えとタンパク質分泌機構に関する基礎的理解にも貢献すると期待される。

3. 研究の方法

(1)クワガタムシの菌嚢とフタホシコオロギの腸管から、細菌を分離同定した。クワガタムシ菌嚢から分離された細菌については、抗菌活性の有無を検討した。フタホシコオロギから分離された細菌については、プラスミドによる形質転換後、フタホシコオロギ腸管への再定着を検討した。

(2)ロイヤルゼリーの経口投与が、カイコガとフタホシコオロギの体サイズを増加させるかについて検討を行った。各成長ステージにおける体重の増加、細胞数の増加、細胞サイズの増加について検討を行った。さらに、ショウジョウバエにおいて体サイズの増加効果をもつことが提唱されたロイヤルゼリー中のタンパク質 (MRJP1) について、コオロギに対する体サイズ増大効果を有するか検討した。

4. 研究成果

(1)本研究では、オオクワガタ、コクワガタ、ヒラタクワガタの3種類のクワガタムシの菌貯蔵器官であるミカンギウムから34種類の細菌と真菌の分離同定を行った(図1)。さらに、それらの微生物の培養上清を抽出し、グラム陰性菌である大腸菌、グラム陰性菌である黄色ブドウ球菌、真菌であるクリプトコッカス・ネオフォルマンズに対する抗菌活性を測定した。その結果、大腸菌に対する抗菌活性を示す菌株が25株、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を示す菌株が9株、クリプトコッカス・ネオフォルマンズに対する抗菌活

性を示す菌株が11株存在した。以上の結果は、クワガタムシのミカンギウムが新規抗生物質探索の有用な資源となることを示唆する。

フタホシコオロギの腸管から、細菌の分離同定を行った。その中の1種であるクレブシエラについて、プラスミドによる形質転換を行い、コオロギに経口投与した。その結果、フタホシコオロギの糞から形質転換したクレブシエラが回収された。この結果は、形質転換した常在細菌が殺菌されず、腸管に到達していることを示唆している。

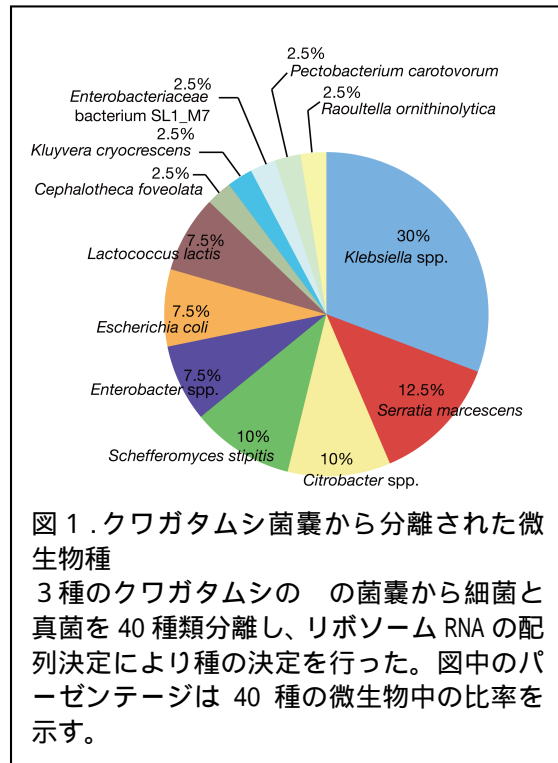


図1. クワガタムシ菌嚢から分離された微生物種

3種のクワガタムシの菌嚢から細菌と真菌を40種類分離し、リボソームRNAの配列決定により種の決定を行った。図中のパーセンテージは40種の微生物中の比率を示す。

(2)ミツバチにおいて、ロイヤルゼリーの摂取が女王蜂への分化に必要な体サイズの増加を引き起こす。ロイヤルゼリーの体サイズの増大活性はミツバチと同じ完全変態昆虫であるショウジョウバエにおいても見出される。本研究において我々はロイヤルゼリーに反応する体サイズ増大機構の昆虫の種類における保存性について検討した。ミツバチのロイヤルゼリーを含むエサをミツバチやショウジョウバエと同じ完全変態昆虫であるカイコガに与えると、通常エサを与えた場合に比べて、幼虫期においては体サイズの変化は認められなかったが、の蛹との成虫体サイズが増大した(図2)。ロイヤルゼリーを不完全変態昆虫であるコオロギに対して与えたところ、幼虫期から体サイズが増大した。ロイヤルゼリーの投与によるコオロギの体サイズ増大はとの両方で見られた(図3)。添加したロイヤルゼリーと同量のタンパク質・脂質・糖を含む餌を与えても、コオロギの体サイズの増大は見られなかった(図3)。以上の結果は、ロイヤル

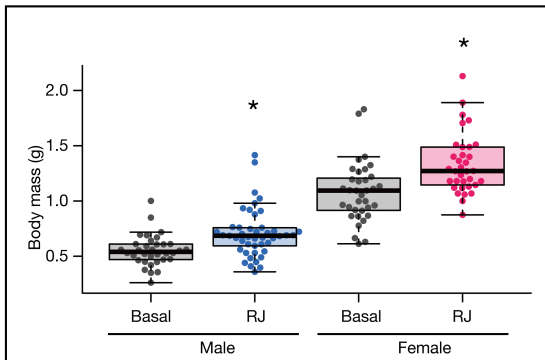


図2 ロイヤルゼリーの経口投与によるカイコガの体サイズの増大
カイコは通常餌 (Basal) もしくはロイヤルゼリー添加餌 (RJ) を与えて育てられた。成虫に羽化した日に、カイコガの体重は計測された。

ゼリーにตอบสนองする体サイズ増大機構が完全変態昆虫と不完全変態昆虫の間で保存されていることを示唆している。

ロイヤルゼリーを投与した昆虫において、細胞の大きさが増大しているか、細胞数が増加しているか検討を行った。ロイヤルゼリーを投与したカイコガにおいては、卵の数の増加が見られ、脂肪体の細胞サイズの増加が観察された。一方、ロイヤルゼリーを投与したコオロギにおいては、脂肪体の細胞サイズは増加していなかった。以上の結果はロイヤルゼリーの効果は組織や昆虫種によって、異なる部分があることを示唆している。

ロイヤルゼリー中の体サイズ増大活性を持つ分子として提唱された MRJP1 について、ネイティブタンパク質とリコンビナントタンパク質の両者について精製とコオロギ体サイズの増大活性の検討を試みた。既報に従い、リコンビナントタンパク質の精製を試みたが、可溶性画分への回収がなされず活性の

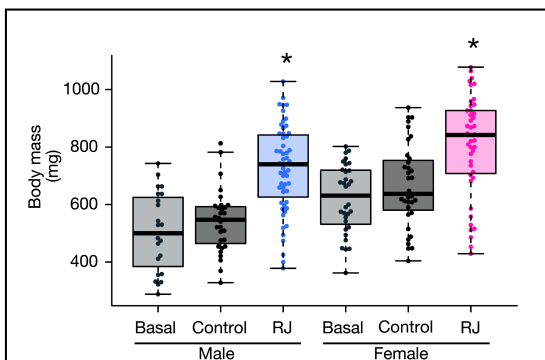


図3 .ロイヤルゼリーの経口投与によるコオロギの体サイズの増大
コオロギ幼虫は通常餌 (Basal) 、ロイヤルゼリー添加餌 (RJ) もしくは、ロイヤルゼリーと同等の糖、脂質、タンパク質を添加した餌 (Control) を与えて育てられた。成虫に羽化した日に、コオロギの体重は計測された。

検討はできなかった。ネイティブタンパク質については、可溶性のタンパク質として精製し (図4) コオロギに対する体サイズ増大活性を検討した。その結果、この MRJP1 ネイティブタンパク質画分には、体サイズ増大活性は見出されなかった。ロイヤルゼリーから体サイズ増大活性を指標とした活性分子の精製と同定が必要だと考えられる。

5. 主な発表論文等

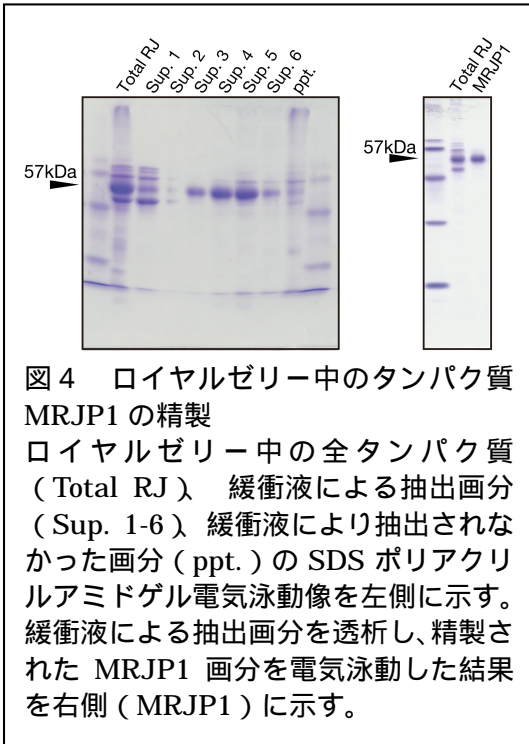


図4 ロイヤルゼリー中のタンパク質 MRJP1 の精製

ロイヤルゼリー中の全タンパク質 (Total RJ) 緩衝液による抽出画分 (Sup. 1-6) 緩衝液により抽出されなかった画分 (ppt.) の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像を左側に示す。緩衝液による抽出画分を透析し、精製された MRJP1 画分を電気泳動した結果を右側 (MRJP1) に示す。

(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4件)

Miyashita A, Kizaki H, Sekimizu K, *Kaito C: Body-enlarging effect of royal jelly in a non-holometabolous insect species, *Gryllus bimaculatus*. *Biology Open* 5(6):770-6. (2016) 査読有 doi: 10.1242/bio.019190.

Miyashita A, Kizaki H, Sekimizu K, *Kaito C: No effect of body size on the frequency of calling and courtship song in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. *PLoS ONE* 11(1): e0146999. (2016) 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0146999.

Miyashita A, Takahashi S, Ishii K, Sekimizu K, *Kaito C: Primed immune responses triggered by ingested bacteria lead to systemic infection tolerance in silkworms.

PLoS ONE 10(6):e0130486. (2015) 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0130486.

Miyashita A, Hirai Y, Sekimizu K,
*Kaito C: Antibiotic-producing bacteria
from stag beetle mycangia.
Drug Discoveries and Therapeutics
9(1):33-7. (2015) 査読有
doi: 10.5582/ddt.2015.01000.

〔学会発表〕(計3件)

宮下惇嗣、高橋真司、石井健一、関水
久、垣内力：ペプチドグリカンの経口投与に
よるカイコの緑膿菌に対する感染抵抗性獲
得、第97回日本細菌学会関東支部総会、2014
年10月30日、東京ドームホテル(東京都文
京区)

垣内力：昆虫モデルを利用した細菌-宿
主相互作用の解明、生物の共生進化を考える
(昆虫共生酵母研究会主催シンポジウム)
2015年6月2日、島根大学(島根県松江市)

垣内力：Microbe-host interactions
revealed using the silkworm infection
model、第89回日本細菌学会総会シンポジウ
ム、2016年3月24日、大阪国際交流センタ
ー(大阪府大阪市)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://researchmap.jp/read0123358/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣内 力(KAITO, Chikara)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号：60420238

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし