

平成 29 年 4 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14234

研究課題名(和文)大腸菌メンブランベシクルの糖鎖修飾によるヒト細胞ターゲティング

研究課題名(英文) Targeting of human cells by the glycosylation of outer membrane vesicles of Escherichia coli

研究代表者

田谷 正仁 (Taya, Masahito)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：60144127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌が産生する細胞外小胞であるメンブランベシクル(OMVs)表面の糖鎖修飾を試みた。他種微生物由来の糖結合モジュール(CBM)と、大腸菌の細胞外膜タンパク質OmpWとの融合タンパク質を設計し、大腸菌OMVs上での発現を試みた。結果として、融合タンパク質のOMVs上での発現には成功したことをウエスタンブロット解析により確認した。しかしながら、FITC等の蛍光物質で標識したカルボキシメチルセルロースなどの糖鎖高分子との結合を評価したところ、CBMの有無により有意な吸着量の差を確認できなかったことから、CBMの機能を保持した状態でOMVs上に発現できなかった可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We challenged the glycosylation of outer membrane vesicles (OMVs) produced by Escherichia coli cells for the targeting of human cells. The fusion protein of carbohydrate binding module (CBM) from other bacteria and outer membrane protein W (OmpW) from E. coli was designed for the glycosylation of OMVs. The successful expression of fusion protein on the E. coli OMVs was confirmed by the western blotting. However, examination of glycosylation using fluorescently-labeled carboxymethylcellulose revealed that the absorption of polysaccharide polymer on the OMVs was not promoted by the expression of fusion protein. It was thought to be due to the malfunction of fusion protein on the OMVs.

研究分野：生物化学工学

キーワード：メンブランベシクル 大腸菌 糖鎖修飾 動物細胞

1. 研究開始当初の背景

外膜小胞(Outer Membrane Vesicles; OMVs)とは、微生物の外膜から遊離した直径 20~250 nm の細胞外小胞であり、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る。これまで、OMVs は細胞から不要物を排出する機構であり、それ以外の機能を持っていないと考えられてきたが、近年になって細胞外に排出された OMVs が周囲の細胞に融合することで、様々な物質の運搬に関わっていることが明らかとなってきた。OMVs 内には DNA, RNA やペリプラズムタンパクが含まれ、表面には細胞外タンパク質が多数存在する。OMVs の生理的な機能としては、不要タンパク質などの細胞外への排出、細胞間コミュニケーションに参与するシグナル物質やプラスミド DNA の伝搬、バイオフィーム構造の安定化、他種の微生物や宿主細胞への毒性物質の輸送が考えられている。OMVs に関する研究は、近年注目を集め始めている。また、髄膜炎菌の OMVs は髄膜炎ワクチンとして実際に臨床応用されたという報告は、OMVs の新機能として注目に値する。

2. 研究の目的

2014 年になって、海外の研究グループにより大腸菌由来の OMVs のラットに対するメディカル応用が報告された。これは、大腸菌の OMVs 表面に存在する ClyA タンパク質にガン細胞抗体を連結させ、大腸菌 OMVs にガンターゲティング機能を付与したものであり、OMVs 内にガン細胞増殖を抑制する薬剤を充填することで、生体内でのガン腫瘍の成長後退に成功した初めての例である(ACS Nano, 8:1525 (2014))。しかしながら、この手法では、糖鎖修飾が行われていない OMVs が、微生物細胞外膜と同じ組成を持つため、生体内では高確率で免疫系細胞に捕食されるという欠点を持つ。

一方で、本研究グループではこれまで、セルロース生合成の関連遺伝子である *bcsB* を過剰発現させると、OMVs 生産が大幅に増加することを発見している。本研究では、大量調製が可能となった大腸菌の OMVs に対して、糖鎖修飾などの機能改変を加えた Bio-engineered OMVs を創成し、ヒト細胞へのターゲティング機能を付与することに挑戦する。具体的には、ヒト細胞の顔とも称される細胞表面の糖結合タンパク質(レクチン)に着目し、カセット式に OMVs への糖鎖修飾を行う新技術を開発し、レクチンを介した複数種のヒト細胞へのターゲティングへと応用する。本研究が提案する人工改変型の OMVs は、糖鎖修飾を行うという点でこれまでに報告がなく独創性が高い。マクロファージや白血球による捕食に対する隠れ蓑となるだけでなく、ターゲット細胞のレクチンに合わせた糖鎖を選ぶことで、標的細胞特異的に物質送達を行うことが可能となると期待される。これら、本研究の成果により、安価で

大量調製が可能で大腸菌由来の OMVs を機能化することにより、従来にない医療用の薬剤キャリアとしての利用が可能となる。

3. 研究の方法

(1) 外膜小胞(OMVs)の回収と粒子径評価

大腸菌を LB 培地 80 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。そこに濃度が 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 OMVs を濃縮した。さらに、超遠心分離(109,000 g, 1 時間, 4 °C)により OMVs を回収した。得られた OMVs の確認は、SDS-PAGE による外膜タンパク質(OmpA, OmpC, OmpF)由来のバンドの検出と、ネガティブ染色後の透過型電子顕微鏡(TEM)観察により行った。また、TEM 観察画像から画像上の OMVs の見かけの直径 D_{obs} を算出した。

(2) OMVs のヒトがん細胞への取込み評価

回収された OMVs について、BCA 法を用いたタンパク質量の測定により OMVs 量の定量を行い、FITC による蛍光標識を行った。続いて、蛍光標識した OMVs をヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞の培養液 DMEM 培地中に、タンパク質量基準で等量となるように添加し、24 時間培養を行った。その後、PBS で数回洗浄しトリプシン処理により回収した Caco-2 細胞について、フローサイトメトリーを用いて蛍光強度を測定し、OMVs 取込みの評価を行った。

(3) CBM を提示した大腸菌 OMVs の構築

糖結合モジュール(CBM)に関しては、代表者らはこれまでに、組換え大腸菌によって生産した *Clostridium thermocellum* 由来の CBM30 と、*Paenibacillus curdianolyticus* 由来の CBM3 の蛍光タンパク質との融合タンパク質が、多糖類と非常に強固に結合することを報告している。各 CBM の特徴として、CBM3 は結晶性の多糖類に、CBM30 は結晶性、非結晶性のどちらの多糖類にも、比較的高い親和性を持つことが確認されている。一方で、当研究室では大腸菌の細胞外膜タンパク質 OmpW が、すでに報告されている ClyA よりも高効率に大腸菌 OMVs 表面に局在できることを GFP を用いた融合タンパク質の解析により明らかにしている(データ未公開)。従って、OmpW と CBM30 との融合タンパク質を発現する大腸菌用のプラスミドを作製した。作製したプラスミドを、CBM との相互作用が懸念されるリポ多糖(LPS)の生合成経路を欠損した $\Delta rfaG$ 株に導入し、His タグ抗体を用いたウエスタンブロットによって OMVs 上での発現を確認した。

(4) CBM 提示型の OMVs に対する糖鎖修飾

続いて、CBM30 を提示した OMVs を生産ならびに精製し、種々の糖鎖と結合させることで CBM を介した OMVs への糖鎖修飾を行った。こ

の際に、すでに CBM との結合性が報告されている天然多糖の中で、水溶性であるカルボキシメチルセルロースを FITC によって蛍光標識し、修飾後の OMVs の蛍光強度を測定することで結合性を確認した。

4. 研究成果

(1) 外膜小胞(OMVs)の回収と粒子径評価

図 1A に大腸菌 BW25113 株と産生量が促進するとの報告がある BW25113/*bcsB* 株から回収した OMVs の TEM 画像を示す。OMVs は、大きいものは 150 nm 程度のサイズであったが、BW25113/*bcsB* 株からはそれよりも小さいサイズのものが確認された。続いて、画像処理により各サンプルから計 500 個の OMVs の見かけの直径 D_{obs} を算出した結果を図 1B に示す。まず BW25113 株由来の OMVs に関しては、100-120 nm に分布の極大をもち、平均で 130 nm という結果となった。一方で、BW25113/*bcsB* 株では、大多数の OMVs が 100 nm 以下となり、平均でも 56 nm と、*bcsB* 遺伝子を過剰発現させることで OMVs の D_{obs} が著しく減少した。この結果、*bcsB* 遺伝子を過剰発現すると OMVs の産生量は増加し、そのサイズは小さくなることが明らかとなった。

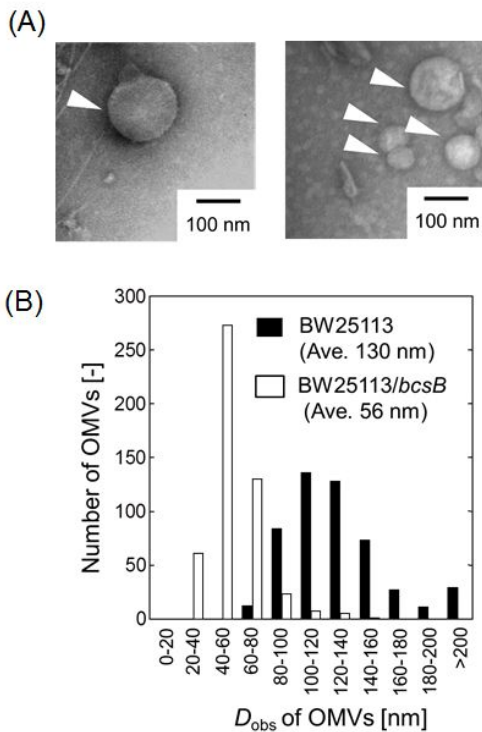
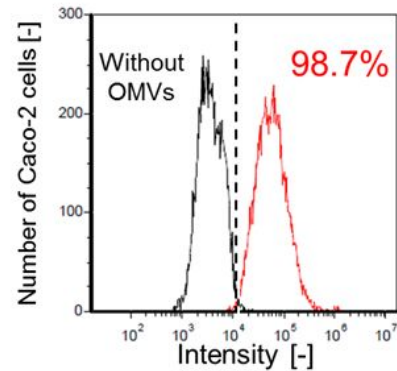


図 1 回収した大腸菌の OMVs. (A) OMVs の TEM 写真。(B) TEM 写真の画像処理より算出した OMVs の見かけ直径の分布。

(2) OMVs のヒトがん細胞への取込み評価

次に、これら平均サイズの異なる OMVs を Caco-2 細胞の培地へ添加した際の 24 時間後の取込み結果を図 2 に示す。どちらの場合でも OMVs を添加して培養した Caco-2 細胞は、添加せずに培養したものと比べ蛍光値がシ

(A) OMVs from BW25113



(B) OMVs from BW25113/*bcsB*

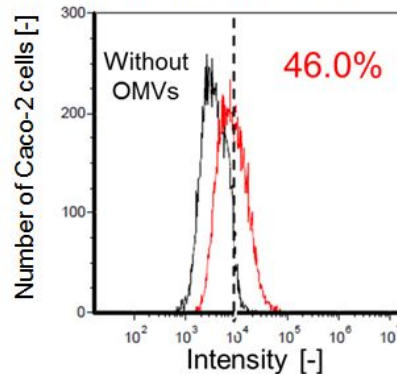


図 2 フローサイトメトリーによる各大腸菌株由来 OMVs の Caco-2 細胞への取込み評価。(A) BW25113 株由来、(B) BW25113/*bcsB* 株由来。

フトしており、OMVs が細胞内に取込まれていることが確認された。BW25113 株由来の OMVs を添加した場合は、およそ 98.7% の Caco-2 細胞に取込まれていることが確認された。一方で、*bcsB* を過剰発現させることで粒径が小さくなった OMVs では、46.0% と取込み効率が大きく低下することが明らかとなった。原因としては、サイズ依存のエンドサイトシス経路の違いが考えられる他、*bcsB* の発現により OMVs 表層に発現しているタンパク質の種類や、表面の疎水度、電荷などの物理特性の違いが生じている可能性がある。

(3) CBM を提示した大腸菌 OMVs の構築

図 3 に回収した大腸菌 OMVs 上での融合タンパク質の発現を確認したウエスタンブロット写真を示す。先行的研究成果により OmpW-GFP が OMVs 上に発現することは確認されていたが、今回の結果により OmpW-CBM30 も同等かそれ以上の量で、大腸菌 OMVs 上に発現していることが明らかとなった。従って、本手法により OMVs 上への糖結合モジュールの提示が可能になった。

(4) CBM 提示型の OMVs に対する糖鎖修飾

続いて、OmpW-CBM30 を発現させた OMVs に

対して、蛍光標識したカルボキシメチルセルロースの吸着を確認したところ、CBM30 を提示していない OMVs と比較して、有意な差を確認することができなかった。ウエスタンブロットの結果から、OMVs 上で発現していることは確認されているため、機能を有した状態で発現していない、ないしは発現の局在が OMVs 表面でなく多糖を吸着できない可能性が考えられた。そこで、CBM30 のコドンが大腸菌用に最適化する、OmpW を短縮させるなど様々な検討を行ったが、最終的に多糖を OMVs 上に有意に吸着させたという結果を得ることができなかった。その他の検討として、これまでに他の研究グループによって大腸菌 OMVs 上に効率的にタンパク質を提示できると報告があった ClyA と CBM30 の融合タンパク質も発現させたが、同様にウエスタンブロットでの発現確認はできたものの、多糖を OMVs 上に有意に吸着させることができなかった。これらの結果から、CBM30 の構造的な特性などから大腸菌 OMVs 上への発現が困難であったと推測される。

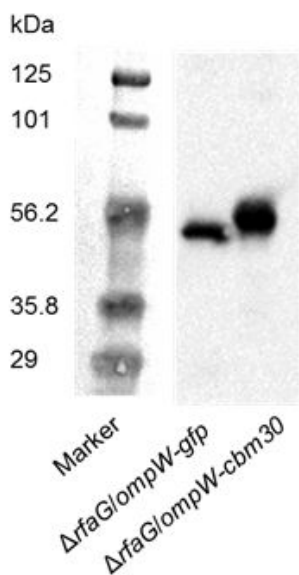


図 3 ウエスタンブロットによる *rfaG* 株由来の OMVs 上での OmpW-GFP, OmpW-cbm30 の発現確認。

5. 主な発表論文等

(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 1 件)

Yoshihiro Ojima, Thivagaran Mohanadas, Kosei Kitamura, Shota Nunogami, Reiki Yajima, Masahito Taya, Deletion of *degQ* gene enhances outer membrane vesicle production of *Shewanella oneidensis* cells. 査読有, Archives of Microbiology, Vol. 199, 2017, 415-423
DOI: 10.1007/s00203-016-1315-4.

〔学会発表〕(計 5 件)

山口京太, 尾島由紘, 田谷正仁, 大腸菌の細胞外分泌機構を利用した物質生産のための基礎研究, 化学工学会第 82 年会, PB212, 東京, 2017 年 3 月

Mohanadas Thivagaran, Kitamura Kousei, Nunogami Shota, Yajima Reiki, Ojima Yoshihiro, Taya Masahito, The role of *degQ* gene in outer membrane vesicle production of *Shewanella oneidensis*, 化学工学会第 82 年会, PB222, 東京, 2017 年 3 月

山口京太, 尾島由紘, 田谷正仁, 機能性タンパク質による大腸菌メンブランベシクルの内部修飾, 日本生物工学会大会平成 27 年度大会, 2P-270, 鹿児島, 2015 年 10 月

尾島由紘, 矢嶋黎輝, 山口京太, 田谷正仁, 大腸菌メンブランベシクルの産生特性とヒト腸管細胞への取込み, 化学工学会第 47 回秋季大会, ZB1P03, 札幌, 2015 年 9 月

〔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://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田谷 正仁 (TAYA, Masahito)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号：60144127

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()