

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15275

研究課題名(和文)細菌の外膜小胞OMVを利用した病原性大腸菌特異的な感染制御法の開発

研究課題名(英文)Development of a method of infection control of EHEC by using outer membrane vesicles

研究代表者

戸邊 亨(Tobe, Toru)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70207596

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)：腸管出血性大腸菌(EHEC) O157を標的とする増殖抑制方法の開発を行なった。EHECに特異的に発現する外膜タンパク質と特異的に結合するタンパク質の結合ドメインをV型分泌蛋白質との融合タンパク質として菌表面に提示した。また、菌に接触依存型増殖阻害因子を強制発現させた。これらを外膜小胞(OMVs)産生が亢進している非病原性大腸菌に導入し、発現させた。この菌が産生するOMVsが、EHECに特異的に結合し増殖抑制効果があることが確認できた。一方、OMVsに存在するLPSのエンドトキシン活性を低減できる遺伝子を同定した。また、OMVsの産生を亢進する遺伝子や培養条件も見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で外膜小胞(OMVs)に任意のタンパク質を積載し表面に提示させることに成功した。また、これを利用し実際にEHECに特異的に結合させ増殖を抑制できることを示せた。この成果は、OMVsが特定の細菌を標的とした増殖阻害法に応用できることを示しており、今後は提示タンパク質や毒素タンパク質を交換することにより様々な病原菌を標的にした増殖抑制剤として展開できる技術基盤を確立した。学術的には、本研究により、エンドトキシン活性を低減するLPSの修飾酵素の発見、OMVs産生を亢進する因子の発見など、新規の知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We have developed the method of growth inhibition specific for EHEC. The fusion proteins, constructed with a type V secretion protein and a domain of a binding protein for EHEC-specific outer membrane protein, was expressed and successfully presented on the surface of non-pathogenic E. coli. And also, we constructed the plasmid for the expression of bacterial toxin whose action is dependent on direct contact with target bacteria. We also found the non-pathogenic E. coli strain producing high amount of OMVs. We showed that OMVs from this strain expressing both the fusion protein and the toxin could bind to EHEC specifically and reduce the growth of EHEC. We also found the gene that can reduce the endotoxin activity of LPS. Furthermore, we found the gene and growth conditions which enhance the production of OMVs in E. coli.

研究分野：細菌学

キーワード：OMVs EHEC 増殖抑制 外膜タンパク質 標的特異的結合

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

1. 研究開始当初の背景

外膜小胞 (OMVs) は、グラム陰性細菌が産生する小胞で、主に外膜よりバディングし形成されると考えられている。OMVs には外膜成分である LPS や外膜タンパク質の他にペリプラズム由来のタンパク質や DNA、RNA なども含まれているとの報告がある。OMVs の応用研究は主にワクチン開発が行なわれているが、基礎的な研究の段階であった。OMVs を特定の菌に対するデリバリーシステムとして利用する報告はなかったが、研究代表者の以前の研究で、OMVs により薬剤耐性因子を低頻度ではあるが、移送できることが示せた。また、腸管出血性大腸菌 EHEC に特異的に結合できるペプチドを外膜タンパク質との融合タンパク質として菌表層に発現させることも達成できていた。本研究はこの成果をさらに発展させ、実際に OMVs に EHEC 特異的結合因子の融合タンパク質を搭載させ、OMVs を特異的に結合させることが可能か検証する。また、増殖を阻害する因子として非分泌性毒素である接触依存性毒素を利用し、その可能性を検討する。これらの試みは、以前にはまったく報告のなかったものであり、成功すれば初めての例となり、さらなる展開が期待できるものとなる。

2. 研究の目的

本研究課題では、新たな感染制御法としてグラム陰性菌が作る外膜小胞 (OMVs: outer membrane vesicles) を道具として用い、1) これに EHEC に特異的に結合する因子を表層に保持させ、2) 増殖阻害や病原性抑制できる因子を EHEC に特異的に送り込む手法を開発することを目的とした。さらに、効率的に OMVs 産生を促進する培養条件および高産生株の選定を行なうこととした。

3. 研究の方法

以前の研究で OMVs がデリバリーシステムとして利用できる可能性が高いことが示された。そこで、下記に挙げる項目について実用的なレベルにすることを計画する。すなわち、1) OMVs の EHEC や EPEC への特異的ターゲティング、2) エンドトキシン活性の低減、3) OMVs 産生量の増大化、4) EHEC や EPEC の増殖や病原性を抑制する因子、である。方法は、大腸菌に主に候補となる遺伝子を改変して導入し、その効果を検証していくこととした。以下に具体的な方法を示す。

1) OMVs を EHEC や EPEC に特異的にターゲティングさせる方法の開発

まず、EHEC の表層に存在し、その他の菌種や常在性の大腸菌に存在しない因子をターゲットとすることにした。すなわち、EHEC 特有の病原因子である細胞付着因子が候補となる。この付着因子が認識する受容体の結合ドメインを OMVs の表層に提示させる。そのためには、自己分泌型外膜タンパク質 (V 型分泌タンパク質) との融合タンパク質を、OMVs を産生させる菌に発現させる。

2) 効率的に OMVs を産生させる方法の開発

OMVs の産生に影響すると予想される因子には、遺伝子と培養条件がある。遺伝子は外膜タンパク質 OmpT の遺伝子、および lipid A の脱アシル化酵素 LpxR の遺伝子である。培養条件は、膜ストレスについて検討した。さらに、様々な大腸菌株における OMVs 産生量を比較し、同一培養条件下においても産生量の多い株を選別する。

3) OMVs に組み込む細菌増殖阻害因子あるいは病原性発現抑制因子の検討

標的細菌に特異的に作用するためには、分泌性ではないが標的細菌に取り込まれる阻害因子が理想的である。接触依存性毒素は一部の菌が保有し近縁の菌種の増殖を阻害することが知られている。そこで、OMVs 産生菌に接触依存性毒素を人為的に

発現し、OMVs に搭載させる。あるいは、非分泌性とした細菌毒素を試みる。

4 . 研究成果

EHEC O157 に特異的に発現している外膜タンパク質に特異的に結合するタンパク質の結合ドメインを OMVs 産生大腸菌の表層に外膜タンパク質との融合タンパク質として発現させた。実際に、菌体表面および OMVs に産生させることを確認した。この融合タンパク質を産生する大腸菌より OMVs を精製し、EHEC O157 に対する結合を検討したところ、結合ドメインを持つ融合タンパク質を発現する大腸菌より精製した OMVs のみが EHEC O157 と結合し、対照の結合ドメインを持たないタンパク質を発現させた大腸菌の OMVs は全く結合しなかった。

2) 大腸菌は通常の培養条件下でも外膜小胞 (OMVs) を産生するが、より効率よく産生させる条件を検討した。一つの手法は、OMVs の産生の調節に関する報告のある *ompT* 遺伝子の効果について検討した。その結果、OMVs の産生量は *ompT* 遺伝子の発現と正に相関することが確認できた。さらに、OmpT 蛋白質の産生量を段階的に増加させたところ、ある閾値を越えると OMVs 放出量が OmpT の増加とともに増大することを見だし、OmpT 蛋白質は積極的に OMVs 産生を促進する因子であることを明らかにした。一方、腸管出血性大腸菌 EHEC における OmpT の役割の解析で、*ompT* 遺伝子が主要な病原性レギュロンに組み込まれており、病原性遺伝子群の活性化条件により発現活性化することを見いだした。さらに、それに伴い OmpT を搭載した OMVs の産生量も増加し、OmpT の標的である抗菌ペプチド LL-37 の攻撃から菌を遠隔で保護する役割があることが明らかとなった。

もう一つは、LPS の構造変化による OMVs の産生量に対する効果を検討した。lipid A の脱アシル化酵素の一つである LpxR を大腸菌に導入し、その OMV 産生に対する効果を検討したところ、効果は弱いながらも OMVs の産生量の増加が認められた。LpxR による lipid A の改変は、同時にエンドトキシン活性も減弱させることを明らかにしており、*lpxR* 遺伝子も OMVs 生産に利用できると考えられた。

さらに、大腸菌のいくつかの菌株について OMVs の産生量を比較検討したところ、通常の培養条件下でも産生量が高い株を見いだした。

3) 対象となる菌の増殖を抑制する手法については、接触依存性増殖阻害を引き起こす毒素を人為的に発現調節できるプロモーターと融合させた融合遺伝子をプラスミド上に作製した。これを非病原性大腸菌に発現させたところ、EHEC との共培養において、EHEC の増殖を抑制する活性があることが確認できた。そこで、OMVs 高産生大腸菌株に毒素を発現させ OMVs を精製し、これを EHEC O157 に作用させた。その結果、結合ドメイン含有融合タンパク質を発現し、さらに毒素を産生する大腸菌より精製した OMVs が他の対照菌株より精製した OMVs と比べ 10 倍程度の増殖阻害効果を示した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- 1) Ogawa, R., H. Yen, K. Kawasaki & T. Tobe, (2018) Activation of *lpxR* gene through enterohaemorrhagic *Escherichia coli* virulence regulators mediates lipid A modification to attenuate innate immune response. *Cell Microbiol* 20: e12806. (査読有り)
- 2) Urashima, A., A. Sanou, H. Yen & T. Tobe, (2017) Enterohaemorrhagic

Escherichia coli produces outer membrane vesicles as an active defense system against antimicrobial peptide LL-37. *Cell Microbiol* **19**: e12758. (査読有り)

〔学会発表〕(計 12 件)

- 1). 山田智未、顔宏哲、戸邊亨. 腸管出血性大腸菌 EHEC における細胞付着後の鞭毛発現制御. 第 71 回日本細菌学会関西支部総会、大阪、10 月 28 日、2018.
- 2). 名田理沙、顔宏哲、戸邊亨. 上皮細胞の炎症応答による EHEC の病原性活性化. 第 71 回日本細菌学会関西支部総会、大阪、10 月 28 日、2018.
- 3). 古賀美歌、顔宏哲、戸邊亨. EHEC における persister の出現と病原性発現の関連についての解析. 第 71 回日本細菌学会関西支部総会、大阪、10 月 28 日、2018.
- 4). 浦島晶子、顔宏哲、戸邊亨. Enterohaemorrhagic *E. coli* produces OMVs as an active defense system against antimicrobial peptide. 第 90 回日本細菌学会総会、仙台、3 月 19-21 日、2017
- 5). 狩野真樹、Hilo Yen、戸邊亨. 病原性大腸菌の病原因子 NleA による ASC 非依存的インフラマソームの細胞死抑制機構の解析. 第 90 回日本細菌学会総会、仙台、3 月 19-21 日、2017 .
- 6). 岸大地、顔宏哲、戸邊亨. 腸管出血性大腸菌の病原性遺伝子発現に關与する non-coding RNA. 第 70 回日本細菌学会関西支部総会、大阪、11 月 25 日、2017.
- 7). Toru Tobe. Harnessing a variety of tools for successful infection by Enterohaemorrhagic *E. coli*: more than T3SS effectors and shiga toxin..International Conference of Nutrition and Food Safety, Taipei, Taiwan. Dec. 4, 2017.
- 8). 狩野真樹、顔宏哲、戸邊亨. 腸管病原性大腸菌 EPEC の病原因子 NleA による細胞死抑制第 89 回日本細菌学会総会、大阪、3 月 23-25 日、2016
- 9). 顔宏哲、狩野真樹、浦島晶子、戸邊亨. The mechanism of EspJ-induced cell death during the infection of EPEC and EHEC. 第 89 回日本細菌学会総会、大阪、3 月 23-25 日、2016
- 10). 戸邊亨. 細菌におけるゲノム規模での転写解析. 第 89 回日本細菌学会総会、大阪、3 月 23-25 日、2016
- 11). 浦島晶子、顔宏哲、戸邊亨. 腸管出血性大腸菌の外膜小胞 (OMV) による抗菌ペプチドからの防御機構. 第 69 回日本細菌学会関西支部総会、大阪、11 月 19 日、2016
- 12). 浦島晶子、顔宏哲、戸邊亨. 腸管出血性大腸菌 EHEC の病原性における OmpT protease (OmpT) の役割. 第 89 回日本細菌学会総会、大阪、3 月 23-25 日、2016

〔図書〕(計 1 件)

感染の防御. 微生物検査学 (第 2 版) 近代出版 p41-48, 2016

〔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

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。