

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670211

研究課題名(和文)細菌が産生する微小膜胞を利用した感染制御法の開発

研究課題名(英文) Manipulation of bacterial membrane vesicle for infection control applications

研究代表者

戸邊 亨 (TOBE, Toru)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70207596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ほとんどの細菌が膜胞を産生することが最近の研究から明らかになってきた。グラム陰性菌の膜胞は、外膜小胞(OMV)として外膜から作られることが知られている。今回の研究では、主に大腸菌を用いて以下の結果を得た。OMVの産生は、菌株により異なること、培地に添加する因子により変動すること、細胞質由来の蛋白質は細菌間で伝達できる可能性があることが示唆された。一方、外膜表層に任意の蛋白質断片を発現させるシステムを作成し、特定の病原性大腸菌に特異的に結合できる因子を得た。最後に、エンドトキシン活性を減弱できる遺伝子を見いだした。これらの結果は、膜胞を感染制御に応用するうえで有益な情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Almost all bacteria are known to produce membrane vesicle. Outer membrane vesicle is a membrane vesicle produced from outer membrane of gram-negative bacteria. In this project, we aimed to strengthen basic knowledge on OMV characteristics for future application. We used E. coli as a model and obtained the following results. We found that production efficiency of OMV was affected by variety of environmental factors and different among strains, and that only small amount of cytoplasmic proteins were included in OMV. By using kanamycin-resistance as a marker protein, transfer of kanamycin-inactivation enzyme from resistant strain to sensitive strain was suggested. On the other hand, we developed the system to present any protein fragment on cell surface by using an autotransporter protein. Finally, we found the gene that modifies Lipid A and reduces endotoxin activity. These findings are useful for development of OMV-based strategy for infection control.

研究分野：細菌学

キーワード：外膜小胞 デリバリーシステム エンドトキシン

1. 研究開始当初の背景

多くの細菌は外膜小胞あるいは膜胞を産生し、様々な物質を放出していることが知られている。また、細菌間にもコミュニケーションがあり、低分子物質のペプチドやホモセリンラクトン、キノロンなどにより媒介され、共調的な振る舞いが制御されている。一部の因子は、細菌が作り出す膜胞に取り込まれ伝達される。他方、細菌が産生する毒素や病原因子は膜胞に取り込まれ宿主細胞に移入され、病原性に貢献しているとの報告もある。膜胞の形成過程については、細菌外膜の一部がくびれて形成されることが提唱されており、また、宿主細胞へ取り込まれる過程もリピッドラフトと融合し N-WASP 依存的に取り込まれるモデルが提唱されている。一方、細菌間でのコミュニケーションに必須の細菌種の特異的な識別や細菌への取り込みの機構については不明のままであった。低分子物質やタンパク質、核酸などを膜胞に梱包された状態で標的まで到達させることができる輸送システムとして応用できる可能性は高いと考えられた。しかし、不明な点が多く残されており、応用に関する報告はワクチン賦与への応用などに限られており、細菌-細菌間での伝達システムへの応用はほとんどない状況であった。

2. 研究の目的

細菌が産生した特定の因子を特異的に膜胞にパッケージングできれば腸管内などの複雑な環境下でも有効な手段になり得ると考えた。本研究課題では、特に、腸管感染症を引き起こす病原細菌（主に病原性大腸菌）による感染を早期に抑制する新規の手法として細菌による膜胞を介した病原細菌の増殖阻害あるいは殺菌を目指した基盤づくりを行なうこととした。そこで、次の項目を目的として設定した。

(1) 細菌膜胞の産生を上昇させる培養条件や環境因子を同定する。

(2) 簡便に評価できる系を用いて、膜胞への細菌からの封入や細菌間での物質の受け渡しを検出する。

(3) 特定の病原細菌（ここでは病原性大腸菌）に特異的にターゲティングする方法を開発する。

(4) また、外膜小胞はエンドトキシンである LPS が含まれており、エンドトキシン活性を低下させる方法も検討することにした。

3. 研究の方法

細菌の膜胞形成についてすでに情報があり遺伝子操作が容易な緑膿菌や大腸菌を用いて解析を始める。以下の項目について解析を進める。

(1) 膜胞形成の培養条件を検討する。

(2) 菌のペリプラズムにタンパク質を発現させ膜胞への封入される効率について検討

する。

(3) 同一菌種間で膜胞に封入したタンパク質の輸送される効率を検討する。

(4) 菌に標的菌株（異なる菌種）と類似構造の膜成分あるいはそれと親和性のある因子を発現させ膜胞の標的菌への取り込みの可能性を検討する。

(5) LPS の修飾因子を探索し、その作用によるヒト細胞への炎症誘導活性性能への影響について検討する。

4. 研究成果

(1) まず、大腸菌の数株を用いて、外膜小胞(OMV)の精製方法と定量化の方法について検討を行った。通常の前製方法は、培養上清より超遠心分離により OMV を沈殿させる手法を用いるが、ポリエチレングリコール(PEG)を上清に添加し遠心分離により沈殿させる方法を検討した。その結果、PEG により沈殿法でも充分量が再現性良く OMV を回収できることが明らかとなり、以降の実験はすべて PEG 沈殿法で行うこととした。また、OMV の定量方法については、蛋白質濃度や顕微鏡観察などの方法が知られているが、OMV の膜成分であるリン脂質の量を測定できる SynaptoRed を検討した。その結果、SynaptoRed による測定法は蛋白質量と相関し、簡便で信頼できる手法であることが明らかとなった。以降の実験では、定量は SynaptoRed による方法を用いることにした。

(2) 大腸菌の株間での相違や様々な培養条件の影響の相違を検討した。大腸菌の複数の菌株（野生株）について LB 培地で培養後、時間経過とともに産生される膜胞を定量したところ、株により産生量が異なること、増殖相が後期になる方が増加することを確認した。そこで、膜胞産生量の多い2株を選び、以降の実験に用いることとした。

(3) 腸管環境に存在する環境因子や抗生物質などの効果を検討した。すべての因子について、増殖に影響を与えない最大の濃度を決定し実験に用いた。その結果、胆汁酸が膜胞産生を増加させること、一方、重炭酸は産生を抑制することを見いだした。さらに、MIC より低濃度で抗生物質を加えて効果を検討したところ、カナマイシン、クロラムフェニコールなどのタンパク質合成阻害作用のあるものでは、影響が認められなかったが、アンピシリンのような細胞壁合成の阻害剤では、膜胞形成が増大することを見いだした。しかし、細胞膜に直接作用するポリミキシン B による効果は認められなかった。

(4) OMV への物質の取り込みを検討した。指標としたのは、人為的に発現させた MBP (maltose binding protein) である。これをペリプラズムあるいは細胞質に発現させ、膜胞への取り込みを検討した。その結果、ペリ

プラズムの MBP は取り込まれるが、細胞質の MBP は膜胞にごく一部しか取り込まれないことが明らかとなった。

(5) 次に、OMV を介した物質の輸送の可能性を検討した。高感度で検出するために抗生剤耐性因子を指標にして検討を行った。カナマイシン感受性菌を耐性菌と混合培養し、カナマイシン添加後に感受性菌の生存率を計測したところ、混合培養しなかった場合と比較し、感受性菌の生存率の有意な上昇が認められた。このとき生育した菌は、カナマイシンに対する耐性を恒常的には示さなかったことから遺伝子の獲得によるものではないことが確認できた。そこで、耐性菌の培養上清より OMV を精製し、感受性菌と混合した後、カナマイシンに曝露し生存率に対する影響を検討した。しかし、単純に PEG で沈殿させた OMV 画分を添加して培養しただけでは、感受性菌の生存率は上昇しなかった。

(6) OMV 表層に EHEC や EPEC 特異的な結合分子を発現させるためのプラットフォームの作成を行った。すなわち、単独分子で菌体表面に表出される蛋白質であるオートトランスポーターの一つ YfaL の遺伝子を誘導可能なプロモーターの下流に融合し大腸菌に発現させた。実際に YfaL が発現誘導条件下で菌を培養すると菌体表層に発現することを確認した。

(7) EHEC や EPEC に特異的に結合する因子を検討した。候補として、両菌種に共通の細胞付着因子 intimin に特異的に結合する Tir を選び、その利用可能生について検証した。すなわち、EPEC あるいは EHEC 由来の Tir の intimin 結合ドメインを MBP との融合蛋白質として産生させ、精製し、これが EHEC や EPEC 表面に特異的に結合することを確認できた。また、EPEC および EHEC への結合には菌株特異性が無いことが確認でき、両菌種に広く使用可能であることが強く示唆された。

(8) OMV は LPS を含むことから強いエンドトキシン活性があることが予想される。実際に応用し生体に使用するには、エンドトキシン活性を低減させる必要がある。そこで、LPS の成分である Lipid A のエンドトキシン活性（炎症応答誘導活性）を低減させる修飾酵素について解析を進めた。病原性大腸菌の持つ lpxR 遺伝子の産物は、アミノ酸配列の相同性から 3'-O-deacylase であることが想定された。そこで、lpxR 遺伝子をクローン化し大腸菌に発現させた後、lipid A を精製し、ヒト細胞に対する影響を観察した。その結果、lpxR 遺伝子を導入した菌から精製した lipid A は、lpxR 遺伝子を持たない菌より精製した lipid A に比べ、炎症応答誘導活性が大きく低下することが明らかとなった。

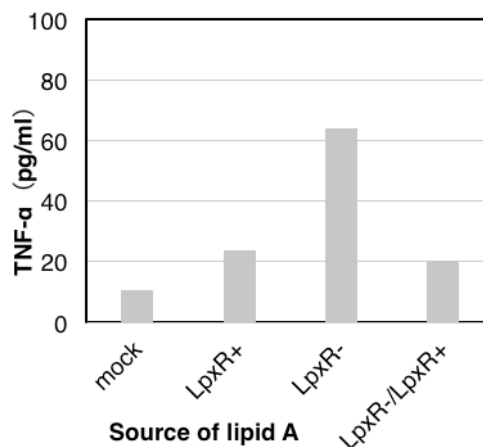


図 lpxR 遺伝子による炎症応答軽減

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0件)

[学会発表](計1件)

小川里佳子、顔宏哲、戸邊亨「腸管出血性大腸菌 EHEC の病原性における lpxR 遺伝子の役割」第 68 回日本細菌学会関西支部総会・学術講演会、2015 年 11 月 28 日、京都

[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

6 . 研究組織

(1)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