

「低温適応細菌の外膜小胞生産機構の解明と応用」

京都大学 化学研究所

川本 純

【諸元】 全ての細菌は 25-400 nm の膜に覆われたカプセル状微粒子を分泌する。これらの細胞外微粒子は細胞外膜小胞 (extracellular Membrane Vesicles, MVs) や外膜小胞 (Outer Membrane Vesicles, OMVs) と総称される。MVs は細菌の細胞塊 (バイオフィルム) 形成や病原性因子のキャリアとして機能することが知られており、細菌間および細菌-宿主間の情報伝達ツールとして細菌の生存戦略において重要な役割を担っていると考えられている。一方で、細菌による MVs 生産は、ワクチン開発や薬物送達のパラドキシム、MVs を足場とするナノリアクター、MVs 分泌を介した異種タンパク質分泌生産など多様な産業分野での応用展開が期待されている。このように基礎生物学および応用微生物学分野で注目されている細菌の MVs であるが、その生産機構の分子基盤の詳細は未だあきらかにされていない。これは、大腸菌などのモデル細菌の MV 生産量の低さや、MVs に輸送されるタンパク質などの生体分子が多様であること、また菌株や培養条件で積荷分子が変化し多岐にわたることが MV 研究を困難にしている。

本研究では、MV 研究のモデル細菌として、我々がマアジの腸より単離したグラム陰性の低温適応細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 を使用する (Chen et al. 2019)。本菌は、大腸菌や他のグラム陰性細菌に比べ 10-1000 倍まで MVs を生産する。さらに、本菌の MVs は、機能未知のタンパク質 P49 がほぼ単一の積荷タンパク質として輸送していたことから、*S. vesiculosa* HM13 は高度に選択的な積荷タンパク質輸送機構と秀でた MV 生産機構を有しているといえる (Fig. 1)。本研究では、本菌の MV 高生産の分子基盤の解明を目的とし、ランダム変異導入と曲率認識ペプチドを利用したハイスループットスクリーニングによる MV 生産関連遺伝子の網羅的探索を試みた。

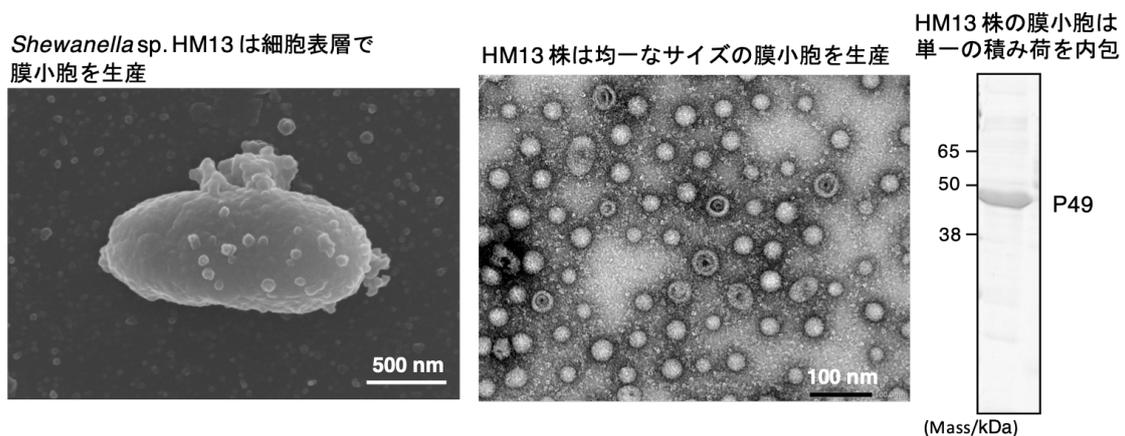


Fig. 1 MV 高生産性の低温適応細菌 *S. vesiculosa* HM13

【結果と考察】 *S. vesiculosa* HM13 のゲノムを標的にランダムに変異を導入するために、トラン

スポゾン遺伝子を有するプラスミド pMinihimer RB1 を本菌に導入した。得られた形質転換体(約 10,000 コロニー)をそれぞれ 96 穴プレートに植菌した。18 °C で培養した培養液中に含まれる MVs を定量的に評価するため、本菌の細胞存在下で MV を選択的に蛍光標識する曲率認識ペプチド NBD-nFAAV5 を添加した。本ペプチドは、真核生物が有する曲率形成タンパク質 BAR ドメインタンパク質の配列をもとに設計されており、高曲率の膜表面に生じる脂質パッキング欠損 (lipid-packing defect) と相互作用し、両親媒性ヘリックスを形成する。その結果、nFAAV5 の末端に導入した蛍光発色団 NBD が膜の疎水的環境に晒されることで、蛍光強度が増加する。したがって、本実験で作製したランダム変異株それぞれの MV 生産性の変化を蛍光強度の増減で評価することが可能となる (Kawano et al. 2020)。曲率認識ペプチドをもちいたハイスループットスクリーニングを行い、本菌のランダム変異株(約1万株)を対象に MV 生産性を評価した。野生株に対して 2 倍以上の MV 生産性向上および 50% 以下の MV 生産性低下株を、さらにナノ粒子軌跡法による粒子濃度、粒径分布測定を行い、再現性よく MV 生産性が向上した株を 10 株、低下した株を 5 株取得した。これらの株について、変異箇所を同定することでトランススポゾン挿入によって破壊された遺伝子を同定した。その結果、グルタミン酸代謝や糖合成、ピルビン酸の合成に関与する遺伝子群が同定された。さらに、細菌のペリプラズム空間においてタンパク質に品質管理に寄与することが報告されているペプチダーゼ (Dcp, dipeptidyl carboxy peptidase) が、本遺伝子を欠損することで MV 生産性が上昇する遺伝子として同定された。本遺伝子の欠損により、ペリプラズム空間でのミスフォールドしたタンパク質が増加することで、MV 生産が増加するものと予想される。本研究より見出された MV 関連遺伝子は、これまでに細菌の MV 産生との報告例はなく、本菌が有する新規の MV 高生産機構に関連することが予想される。また、MV 生産性が向上した株については、本研究において野生株の 5 倍まで MVs を生産する株を取得することに成功している。本株については、MV をキャリアとする異種タンパク質分泌生産系の宿主細胞への応用が期待される。

最後に、本研究は財団法人杉山産業化学研究所の助成により実施されたものであり、貴財団には改めて御礼申し上げます。

#### 【引用文献】

- Chen, Chen, Jun Kawamoto, Soichiro Kawai, Akihiro Tame, Chiaki Kato, Tomoya Imai, and Tatsuo Kurihara. 2019. "Isolation of a Novel Bacterial Strain Capable of Producing Abundant Extracellular Membrane Vesicles Carrying a Single Major Cargo Protein and Analysis of Its Transport Mechanism." *Frontiers in Microbiology* 10: 3001.
- Kawano, Kenichi, Fumiaki Yokoyama, Jun Kawamoto, Takuya Ogawa, Tatsuo Kurihara, and Shiroh Futaki. 2020. "Development of a Simple and Rapid Method for In Situ Vesicle Detection in Cultured Media." *Journal of Molecular Biology* 432 (22): 5876–88.