

令和元年度農学部特別研究費研究経過報告書

1. 研究者名 上垣 浩一
2. 研究課題名 腸内細菌および発酵食品由来細菌が生産する膜小胞の生理機能解析
3. 研究目的・内容

腸内細菌や発酵食品由来の細菌を活用した生体機能の維持・向上が注目されているが、分子のレベルでは“何が”、“どのように”といった生理活性物質や作用機構については未解明な点が多い。細菌が分泌する膜小胞に関して以下の研究を行った。①膜小胞成分の分析とその作用機構の解明、②新たな微生物からの膜小胞スクリーニングと生理機能の関わりでの解明。

4. 研究の経過

① 膜小胞成分の分析とその作用機構の解明

a) 枯草菌膜小胞成分の分析

まず多量の膜小胞を菌体外に生産する枯草菌を独自に見いだした。次に産出する膜小胞の回収方法を構築した。さらに本膜小胞の物理化学的特徴を検討した。その結果、電気抵抗ナノパルス法により本菌株の培養液には少なくとも 10^8 個/mL の膜小胞（粒径およそ 100 nm）が含まれることがわかった。この粒径は、TEM 観察や動的光散乱での測定結果と一致していた。本膜小胞のゼータ電位は -9.1 mV であった。

さらに本膜小胞には、主にタンパク質や DNA が含まれることを示した。N 末端アミノ酸配列解析によって主要なタンパク質 P75 を同定できて、本菌株のゲノム解読によって P75 をコードする遺伝子を明らかにできた。P75 については異種発現系を構築して、膜小胞中での機能を検討している。一方、膜小胞中の DNA を分析した結果、菌株のゲノム DNA 全体が断片化して膜小胞に存在することを明らかにできた。

現在、微生物由来の膜小胞は、新しいアジュバントとして病原菌やウイルスに対するワクチン開発に応用することが期待されている。そこで枯草菌の膜小胞による宿主細胞への認識を検討した結果、本膜小胞は Toll 様受容体によって認識されることを見いだした。

b) 乳酸菌由来の膜小胞中に含まれるタンパク質の同定及び発現系の構築

申請者は、乳酸菌・ビフィズス菌が膜小胞を生産すること、さらに乳酸菌・ビフィズス菌の膜小胞による免疫賦活作用を細胞レベルで見いだした。現在、これらの膜小胞による細胞応答の作用機序や因子は不明である。これらの膜小胞を用いて、細胞受容体を分析した。次に主要タンパク質を同定できたので、これらのタンパク質が作用因子として機能するかを検討するために異種発現系の構築を行った。

c) 大腸菌膜小胞成分の分析

大腸菌は膜小胞を生産するが、細胞へ作用する仕組みは不明である。そこで膜小胞のタンパク質を蛍光標識し、細胞との相互作用をイメージングすることを目的とした。まず大腸菌膜小胞を回収して、MALDI-TOF-MS を用いた PMS 法によって膜小胞中の主要なタンパク質 ompF を同定した。現在、ompF と緑色蛍光タンパク質 GFP をキメラ化させるために、ompF-GFP 発現系の構築に取り組んでいる。

② 新たな微生物からの膜小胞スクリーニングと生理機能の関わりでの解明

本研究によって多様な細菌が膜小胞を産出することが明らかになってきたが、真核微生物も膜小胞を産出するかどうかは不明のままである。そこで膜小胞を生産する酵母の探索を行っている。

5. 本研究と関連した今後の研究計画

① 膜小胞成分の分析とその作用機構の解明

R1 年度の成果より、多様な有用細菌が膜小胞を生産すること、膜小胞生産菌のスクリーニング方法を独自に開発できた。さらに各種の細菌由来の膜小胞による免疫賦活作用を検出できた。この細胞応答は、ワクチン開発や抗がん剤の開発に応用しうるものであった。細菌由来のリポタンパク質によって各種サイトカインの産生を誘導することが報告されているように、タンパク質成分が免疫応答に関与する事が報告されている。これは膜小胞の役割が、宿主細胞へのタンパク質輸送に関与している可能性が示唆される。今後は同定したタンパク質を用いて細胞応答を誘導するのか、また標識した膜小胞を用いて細胞との相互作用をイメージングすることを行っていく。

② 細胞外膜小胞を生産する微生物の探索

発酵食品の中でも黒酢は複雑な細菌群集が生み出す、特徴的な発酵食品である。黒酢の発酵に関与する酢酸菌の膜小胞は検出できたので、膜小胞による生体による影響を明らかにしていく。さらに真核微生物が果たして膜小胞を産出するののかも明らかにしていきたい。