

## 牛血清からのエクソソーム回収法の検討

笠原 喜斗<sup>1</sup>, 河野 竜平<sup>2</sup>, 池上 春香<sup>2</sup>, 越智 浩介<sup>1</sup>, 宮本 圭<sup>2</sup>, 松橋 珠子<sup>3</sup>, 松本 和也<sup>1,2,3</sup>

### 要旨

近年のエクソソーム研究の進展にともない、家畜においてもエクソソームが細胞間の情報伝達物質として様々な生命現象に関与している可能性が明らかになりつつある。しかしながら、エクソソームを人為的に操作する応用的な研究はほとんど報告されておらず、特にエクソソーム回収時に一般的に用いられる超遠心法において、牛血液を対象にしたエクソソーム回収条件を検討した報告は知る限り見あたらない。本研究では牛血清から超遠心法で回収される沈殿中のエクソソームマーカー (CD9) をウェスタンブロット法で検出し、エクソソーム相対量と総タンパク質量とを算出することで最適な超遠心法の条件を検討した。その結果、今回検討した条件中では、遠心力は 100,000×g および 150,000×g、遠心時間は 120 分 および 180 分の遠心条件でエクソソームの回収量が最大となり、このうち 100,000×g、120 分の遠心条件は夾雑タンパク質量を少なくしつつ多くのエクソソームを回収できた。以上の結果より、牛血清を対象にしたエクソソーム回収条件を同定したことが示唆された。

キーワード：ウシ血清、エクソソーム、マイクロ RNA、超遠心法、CD9

### 1. 緒論

Valadi らによってエクソソームが細胞間の情報伝達を担っていることが示唆されてから、エクソソーム研究への関心は年々高まりつつある<sup>(1)</sup>。例えば、エクソソーム中のマイクロ RNA (miRNA) が疾病のバイオマーカーとなる可能性を示した研究や、エクソソームに核酸を封入し標的組織に送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) の担体としての利用を検討した研究が報告されている<sup>(2,3)</sup>。エクソソームは直径が約 100nm の脂質二重膜小胞であり、その内部にタンパク質や miRNA、mRNA などの核酸を内包している<sup>(4)</sup>。そして、内包する核酸やタンパク質を標的細胞に送達する<sup>(1,5)</sup>。miRNA は 17~25 塩基の non-coding RNA の一種であり、標的 mRNA の分解あるいは翻訳抑制により、転写後の遺伝子発現を調節する<sup>(6,7)</sup>。エクソソームに内包される miRNA はエクソソームを取り込んだ細胞内に送達され、その遺伝子発現制御作用を発揮することが明らかになっている<sup>(1)</sup>。以上の様にエクソソームは広範な生命現象に関わっていることから、エクソソームの解析は肉用牛の肥育技術をはじめとする家畜飼養技術の発展にも重要な役割を果たすと考えられる。

既に肉用牛では、給与飼料の種類と牛血漿中エクソソームに含まれる miRNA との間に関連があることが報告されている<sup>(8)</sup>。また当研究室の研究では、牛血清に含まれる一部の miRNA の量が枝肉形質と関係していることを示唆する結果を得ている (未発表)。しかしながら、超遠心法を用いて牛の血液からエクソソームを回収する条件を検討した報告は無く、超遠心法を用いた牛血清からのエクソソームの回収も報告されていない。

そこで本研究では、一般的なエクソソーム回収法として知られる超遠心法で、解析対象であるエクソソーム

原稿受付 2020 年 2 月 13 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.18-I-2, 2019 の助成を受けた。

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 近畿大学先端技術総合研究所, 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

ームを牛血清中から効率よく回収する方法の確立を目的に、遠心力と遠心時間を変化させて最適な回収条件の検討を行った。回収した画分はウェスタンブロット法でエクソソームの含有量を求め、夾雑タンパク質量と比較した。また、回収した画分を透過電子顕微鏡で観察しエクソソームが含まれることを確認した。

## 2. 材料と方法

### 2. 1 材料

材料には、市販の成牛血清 (B9433-500ML、Lot#16A041、Sigma-Aldrich) を用いた。

### 2. 2 超遠心法によるエクソソームの回収

超遠心法によるエクソソーム回収の工程を図1に示した。

解凍した牛血清 10mL は 50mL tubes に入れ PBS 20mL で 3 倍に希釈した。希釈液は  $3,000\times g$  (4313rpm)、20分、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心した (Avanti HP25I、ローターJA12、Beckman Coulter)。遠心後、チューブの底に沈殿を含む液を 2~3mL 残し、オートピペッターで上清 28mL を新たなチューブに回収した (上清①)。次に、上清① 28mL は  $12,000\times g$  (8,626rpm)、40分、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心し (Avanti HP25I、ローターJA12)、上清をデカンテーションで回収した (上清②)。回収した上清② 約 28mL は UC チューブ (13.2mL、331372、Beckman Coulter) に移し、表1に示す9種類の条件、 $4^{\circ}\text{C}$ 、Decel:9 で超遠心を行った (Optima XL100K、ローターSW41ti、Beckman Coulter)。チューブ底にペレットを含む液 (沈殿③) を約  $500\mu\text{L}$  残して上清を除去した。沈殿③はピペティングし再懸濁させたのち、新しい UC チューブに回収し、 $150,000\times g$  (34,900rpm)、180分、 $4^{\circ}\text{C}$ 、Decel:9 で超遠心をした (Optima XL100K、ローターSW41ti)。遠心後、アスピレーターで上清を除去し、沈殿をピペティングで再懸濁して全量  $250\mu\text{L}$  を回収し、エクソソーム画分として以降の実験に供した。

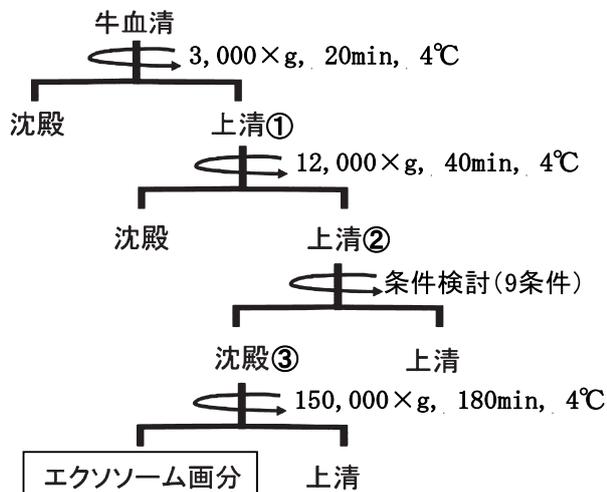


図1 超遠心法によるエクソソーム回収の工程

表1 超遠心法で検討した9種類の条件

平均遠心力	遠心時間
$50,000\times g$	60min
	120min
	180min
$100,000\times g$	60min
	120min
	180min
$150,000\times g$	60min
	120min
	180min

### 2. 3 エクソソーム画分のタンパク質抽出・濃度測定

サンプル  $50\mu\text{L}$  と等量の  $2\times$  非還元 SDS Buffer ( $0.125\text{M}$  Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、20%グリセロール、BPB 適量) を混合した。5分間の超音波処理とボルテックスのセットを3回行い、次の SDS-PAGE に用いた。エクソソーム画分のタンパク質濃度は Bradford 法 (Protein Assay、500-0006、Bio-Rad) を用いて定量した。

### 2. 4 ウェスタンブロット法によるエクソソームマーカーの検出

12% Mini-PROTEAN TGX Gels (456-1046、Bio-Rad) の各レーンにサンプルを  $2\mu\text{L}$  ずつアプライし、300V、

400mA、22分の条件で SDS-PAGE を行った。ゲル上のタンパク質は Trans-Blot Turbo (1704152JA、Bio-Rad) を用い 25V、2.5A、3分の条件で Mini-Fornat 0.2  $\mu$  m PVDF メンブレン (Trans-Blot Turbo Transfer Pack、1704156、Bio-Rad) に転写した。転写後のメンブレンは Block Ace (UKB80、KAC) で 1時間ブロッキングした。1次抗体には抗 CD9 抗体 (2500 倍、11-354-C100、Exbio)、2次抗体には Anti-mouse IgG 抗体 (20000 倍希釈、P0447、DaKo) を用い、それぞれ 1時間反応させた。ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232、GE ヘルスケア) で発光処理をし、Odyssey Fc Imaging System (2801-00、LI-COR) で 60 分間撮影した。確認された CD9 のバンドのシグナル強度を画像解析 (Image Studio Software) を用い定量化し、ポジティブコントロール (ウシ脾臓組織) の値を 1 としてエクソソーム量を相対定量化した。

## 2. 5 Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色によるタンパク質の検出

前述と同一の方法で SDS-PAGE を行った。タンパク質は Quick-CBB PLUS (178-00551、富士フィルム和光純薬) を用いて CBB 染色し、AlphaImager 3400 (2030848、Alpha Innotech) で撮影した。

## 2. 6 電界放出形透過電子顕微鏡によるエクソソームの観察

エクソソーム画分を純水で 10 倍希釈し、弱親水性プラスチック支持膜 (エラスチック Bio フィルム STEM Cu100P グリッド仕様、ELB-C10、応研商事) 上に試料分子を吸着させ、3% リンタングステン酸 (pH7.0) でネガティブ染色した。電界放出形透過電子顕微鏡 (JEOL、JEM-2100F) での観察はマニュアルに従って行った。

## 2. 7 統計学的処理

一連の実験は 4 回反復して実施した。実験結果の統計学的処理は一元配置分散分析と Bonferroni 法により条件間の多重比較を行った。ノンパラメトリック検定は Kruskal-Wallis 検定および Scheffe 検定により条件間の比較を行った。統計学的有意差は 5% 水準未満とした。

## 3. 結果

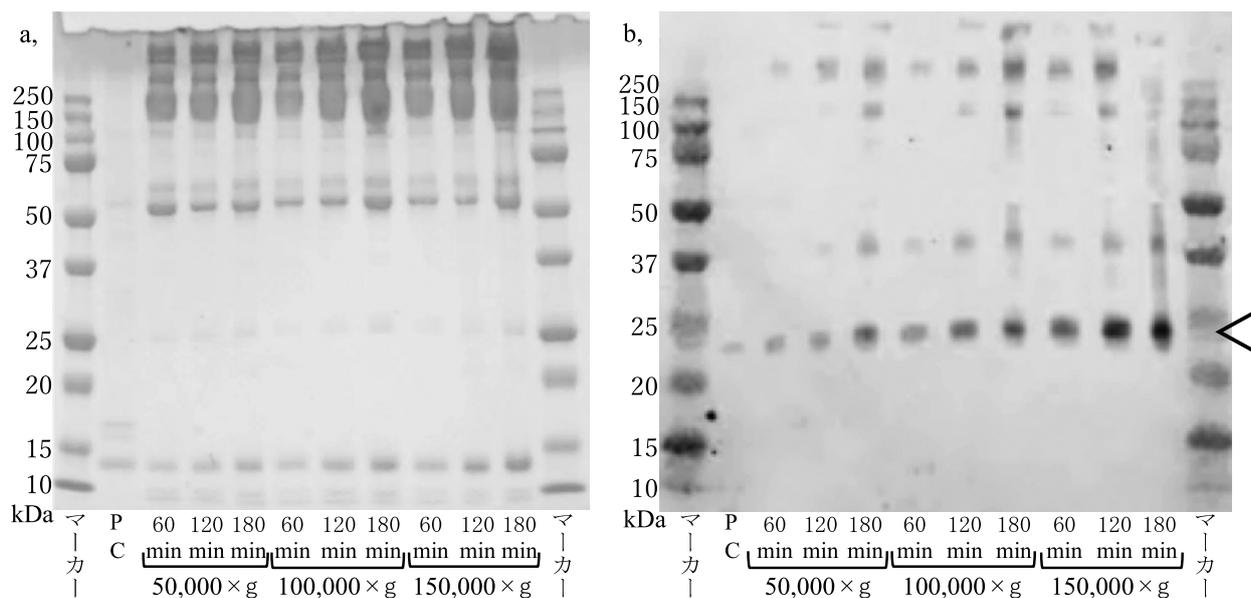


図 2 各超遠心条件で回収したエクソソーム画分の電気泳動像

a, CBB 染色、b, CD9、PC, positive control

CBB 染色では各レーンにタンパク質が確認された (図 2a)。CD9 (分子量 25,258Da) のウェスタンブロットでは 24kDa 付近にバンドが確認された (図 2b)。各遠心条件のエクソソーム画分に含まれた総タンパク質量と、CD9 のシグナル (24kDa 付近) から求めたエクソソーム相対量を表 3 にまとめた。また、エクソソーム画分中のタンパク質 1mg あたりのエクソソーム相対量を求めた (表 3)。9 種類の遠心条件間で回収されたエクソソーム相対量、総タンパク質量、およびタンパク質あたりのエクソソーム相対量を比較した結果、遠心力が大きいほどエクソソームが多く回収されていた (図 3a)。50,000×g および 150,000×g では実験回間のばらつきが大きく、エクソソーム回収量は 100,000×g と 150,000×g の間で有意でなかった。また、エクソソーム画分中の総タンパク質量は 50,000×g、120 分の条件で最も少なく、結果としてタンパク質 1mg あたりのエクソソーム量回収量は 50,000×g、120 分の条件で最も多くなった。しかし、実験回間のばらつきが大きく条件間の差は有意とはならなかった。

150,000×g、120 分の条件で回収したエクソソーム画分を透過電子顕微鏡で観察した結果、約 100nm のエクソソーム様の小胞が複数確認された (図 4)。

表 3 各超遠心条件のエクソソーム画分から得られた総タンパク質量および CD9 シグナルの画像解析によるエクソソーム相対定量の結果

遠心条件		エクソソーム画分の 総タンパク質量(mg)	エクソソーム相対量 (CD9のシグナル 強度)	タンパク質1mgあた りのエクソソーム の相対量
遠心力	遠心時間			
50,000×g	60min	0.447 ± 0.327 <sup>c</sup>	1.847 ± 0.271 <sup>c</sup>	6.213 ± 4.755
	120min	0.412 ± 0.263 <sup>c</sup>	2.257 ± 0.353 <sup>bc</sup>	12.963 ± 17.417
	180min	0.825 ± 0.362 <sup>bc</sup>	3.360 ± 0.898	4.416 ± 1.336
100,000×g	60min	0.488 ± 0.242 <sup>c</sup>	2.632 ± 0.537	6.282 ± 2.860
	120min	0.982 ± 0.130 <sup>bc</sup>	3.912 ± 0.956	4.092 ± 1.369
	180min	1.288 ± 0.216 <sup>b</sup>	4.672 ± 0.410 <sup>ab</sup>	3.685 ± 0.537
150,000×g	60min	0.768 ± 0.244 <sup>bc</sup>	3.554 ± 1.132	4.687 ± 0.736
	120min	1.376 ± 0.312 <sup>b</sup>	5.072 ± 2.092 <sup>a</sup>	3.655 ± 0.937
	180min	2.586 ± 0.284 <sup>a</sup>	5.118 ± 1.649 <sup>a</sup>	1.952 ± 0.413

平均±SD、a,b,c..異符号間で有意差有り、各条件を4回反復して実施

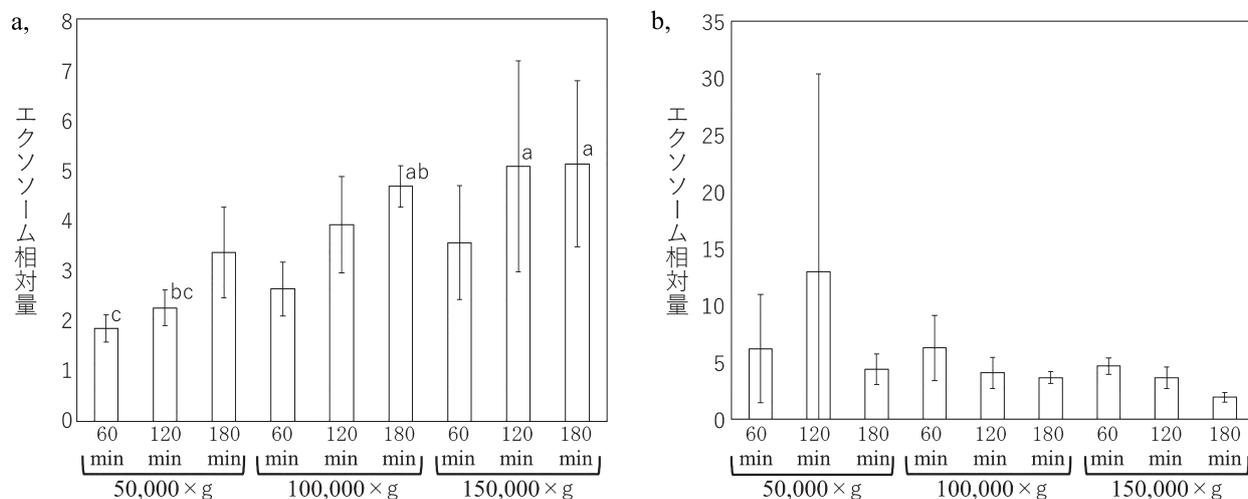


図 3 各超遠心条件で回収したエクソソーム画分中のエクソソーム相対量および総タンパク質量あたりのエクソソーム相対量

a, CD9 シグナルから求めたエクソソーム相対量、b, タンパク質 1mg あたりのエクソソーム相対量

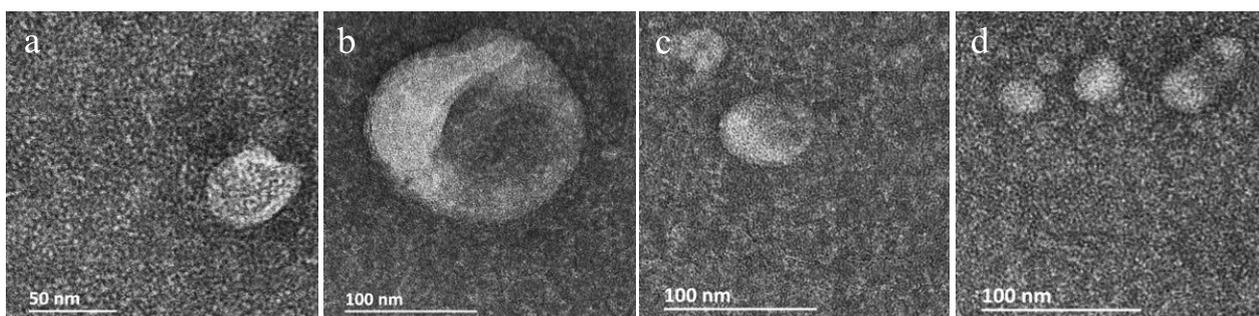


図4 電子顕微鏡による観察像

150,000×g、120分の条件で回収したエクソソーム画分の観察像  
撮影時間 1.0sec、倍率 80,000倍～100,000倍

#### 4. 考察

肥育技術は農家自身の勘や経験に頼っている部分が大きく、高成績な牛を安定的に生産する技術は未だ確立されていない。これまでに、ビタミンAやビタミンC、ビタミンE及び胆汁酸などの物質が枝肉に関係があるとして報告されてきた<sup>(9-13)</sup>。例えば、胆汁酸製剤の場合、飼料に添加して肥育牛に投与することで脂肪交雑が増加することが報告されている。同様に枝肉成績に影響を与える新たな候補因子として、当研究室での研究ではエクソソームとそれに内包されるmiRNAに着目してきた。エクソソームは内包する遺伝子産物を標的細胞に送達することで標的細胞の遺伝子発現を制御可能な小胞であり、DDSの担体として薬のように体外から投与して枝肉成績を制御できる可能性が期待されている。しかしそのためには、あらかじめエクソソームを回収し、標的細胞の特定や作用機序について明らかにしておく必要がある。エクソソームの回収には超遠心法が広く用いられている<sup>(8,14-17)</sup>。しかし牛血中エクソソームを超遠心法で回収する条件を検討した報告や、超遠心法を用いて牛血清中からエクソソームを回収した報告はほとんどない。そこで本研究では、牛血清中からエクソソームを回収する条件の検討を行った。回収したエクソソームの確認には、ウェスタンブロット法によるエクソソームマーカー(CD9)の検出と、電界放出形透過電子顕微鏡により確認する方法を採用した<sup>(14,16-18)</sup>。

その結果、エクソソームの回収量は遠心力が大きく遠心時間が長いほど多くなる傾向が示された。一方、150,000×gでの回収量は安定せず、100,000×g、120分と150,000×g、120分や150,000×g、180分の条件間でエクソソームの回収量に大きな差はなかった。このことから、始めは遠心時間と共にエクソソームの回収量が増えるが、一定の回収量を超えると遠心時間によって回収量が変化しにくくなると考えられた。また、エクソソーム画分中の総タンパク質量は、50,000×g、60分と120分の遠心条件で最も少なく、100,000×g下で60分から180分へ、また150,000×g下で60分や120分から180分へと遠心時間が延長したことによって有意に増加した( $P<0.01$ )。一方、タンパク質量あたりのエクソソーム回収量は、総タンパク質量が少なかった50,000×g、60分と120分、100,000×g、60分ではばらつきが大きく、50,000×g、180分の遠心条件と100,000×g、120分や150,000×g、60分の遠心条件とで同程度であり、100,000×g、120分の遠心条件は、多くのエクソソームを回収しつつ、タンパク質の夾雑を少なく回収出来る条件であることが示された(表3、図3)。

これまでに報告されている超遠心法を用いた血中エクソソームの回収条件は、牛では110,000×g、120分(血漿)や100,000×g、75分(血漿)、200,000×g、75分(血漿)及び100,000×g、120分(血漿)など報告によって異なる<sup>(14-17)</sup>。ヒトでも120,000×g、90分や160,000×g、60分、110,000×g、70分及び100,000×g、70分など、報告によって異なり定まっていない<sup>(19-22)</sup>。遠心力は牛でもヒトでも100,000×g付近が多い傾向が

見られ、遠心時間は牛の血液サンプルの方が長い傾向が見られる。このことから、牛のエクソソームはヒトより沈殿しにくいことが考えられる。

以上より今回検討した条件の中では、実験で多くのエクソソームを回収する必要がある場合には 100,000×g、180 分の遠心条件、最少のタンパク質夾雑量で回収する必要がある場合には 100,000×g、60 分の遠心条件が最適であり、なるべくタンパク質が夾雑しないようにしつつ、多くのエクソソームを回収する必要がある場合には 100,000×g、120 分の条件が最適であった。以上のように、超遠心法を用いて牛血清からエクソソームを回収する場合の、必要に応じたエクソソーム回収条件が明らかになった。

## 5. 結論

本実験では超遠心法の遠心力と遠心時間の条件検討により、回収されるエクソソーム量と総タンパク質量の比較を行った。その結果、遠心力が大きく遠心時間が長い方がエクソソームをより回収できたが、遠心力や遠心時間がある程度以上になると、エクソソームの回収効率は低下する傾向が認められた。100,000×g、120 分の遠心条件での回収は、多くのエクソソームを回収しつつエクソソーム画分中のタンパク質の夾雑を少なく出来る条件であることが示された。

## 6. 謝辞

本研究の推進に際し、多大なるご指導をいただきました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門畜産物研究領域の室谷進氏に深く感謝いたします。

## 7. 引用文献

- (1) Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., Lötvall, J. O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 9, 654-659.
- (2) 落谷孝広 (2017) miRNA の最新知識～基礎領域から診断・治療応用まで～、pp.11-15、医薬ジャーナル社
- (3) 大野慎一郎、高梨正勝、黒田雅彦 (2014) エクソソームによる核酸 DDS の開発、*Drug Delivery System* 29, 134-139.
- (4) Raposo, G., Stoorvogel, W. (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* 200, 373-383.
- (5) Skog, J., Wurdinger, T., Rijn, S. V., Meijer, D., Gainche, L., S-Estevés, M., Curry, Jr. W. T., Carter, R. S., Krichevsky, A. M., Breakefield, X. O. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology* 10, 1470-1476.
- (6) He, L., Hannon, G. J. (2004) Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics* 5, 522-531.
- (7) Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. (1993) The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- (8) Muroya, S., Shibata, M., Hayashi, M., Oe, M., Ojima, K. (2016) Differences in circulating microRNAs between grazing and grain-fed wagyu cattle are associated with altered expression of intramuscular microRNA, the potential target PTEN, and lipogenic genes. *PLOS ONE* 11, e0162496.
- (9) Oka, A., Maruo, Y., Miki, T., Yamasaki, T., Saito, T. (1998) Influence of vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese Black cattle. *Meat Science* 48, 159-167.

- 
- (10) 松井徹 (2015) ビタミン C : 肉用牛の科学、pp.291-293、養賢堂
  - (11) Irie, M., Fujita, K., Sudou, K. (1999) Changes in meat color and alphatocopherol concentrations in plasma and tissues from Japanese beef cattle led by two methods vitamin E supplementation. *Asian-Aust. Journal of Animal Science* 12, 810-814.
  - (12) 三津本充 (1996) ビタミン E とビタミン C による牛肉品質の改善と保持、日本畜産学会報 67, 1110-1126.
  - (13) Irie, M., Kouda, M., Matono, H. (2011) Effect of ursodeoxycholic acid supplementation on growth, carcass characteristics, and meat quality of Wagyu heifers (Japanese Black cattle). *Journal of Animal Science* 89, 4221-4226.
  - (14) Muroya, S., Ogasawara, H., Hojito, M. (2015) Grazing affects exosomal circulating microRNAs in cattle. *PLOS ONE* 10, e0136475.
  - (15) Koh, Y. Q., Almughlliq, F. B., Vaswani, K., Peiris, H. N., Mitchell, M. D. (2018) Exosome enrichment by ultracentrifugation and size exclusion chromatography. *Frontiers in Bioscience* 23, 865-874.
  - (16) Salomon, C., Torres, M. J., Kobayashi, M., Scholz-Romero, K., Sobrevia, L., Dobierzewska, A., Illanes, S. E., Mitchell, M. D., Rice, G. E. (2014) A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLOS ONE* 9, e98667.
  - (17) Mitchell, M. D., Scholz-Romero, K., Reed, S., Peiris, H. N., Koh, Y. Q., Meier, S., Walker, C. G., Burke, C. R., Roche, J. R., Rice, G., Salomon, C. (2016) Plasma exosome profiles from dairy cows with divergent fertility phenotypes. *Journal of Dairy Science* 99, 7590-7601.
  - (18) Caradec, J., Kharmate, G., H-Beheshti, E., Adomat, H., Gleave, M., Guns, E. (2014) Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clinical Biochemistry* 47, 1286-1292.
  - (19) Sugimachi, K., Matsumura, T., Hirata, H., Uchi, R., Ueda, M., Ueo, H., Shinden, Y., Iguchi, T., Eguchi, H., Shirabe, K., Ochiya, T., Maehara, Y., Mimori, K. (2015) Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *British Journal of Cancer* 112, 532-538.
  - (20) Szajnik, M., Derbis, M., Lach, M., Patalas, P., Michalak, M., Drzewiecka, H., Szpurek, D., Nowakowski, A., Spaczynski, M., Baranowski, W., Whiteside, T. L. (2013) Exosomes in plasma of patients with ovarian carcinoma: Potential biomarkers of tumor progression and response to therapy. *Gynecology and Obstetrics (Sunnyvale)* 4, 003.
  - (21) Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., Illei, G. G. (2012) The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLOS ONE* 7, e30679.
  - (22) Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., Seremwe, M., Dismuke, W. M., Bieberich, E., Stamer, W. D., Hamrick, M. W., Liu, Y. (2017) A Comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PLOS ONE* 12, e0170628.

## 英文抄録

## Examination of method to isolate exosomes from bovine serum

Yoshito Kasahara<sup>1</sup>, Tappei Kono<sup>2</sup>, Haruka Ikegami<sup>2</sup>, Kousuke Ochi<sup>1</sup>, Kei Miyamoto<sup>2</sup>,  
Tamako Matsuhashi<sup>3</sup> and Kazuya Matsumoto<sup>1,2,3</sup>

Recent studies on exosomes are uncovering the role of exosomes in various biological functions. However, exosome has not been a major topic in animal science, and the methods to isolate exosomes from bovine blood or serum by ultracentrifugation, which is commonly used for exosome isolation, are not established. In this study, we attempted to establish the optimal ultracentrifugation conditions to collect exosomes. The amount of exosomes collected in the precipitates from bovine serum was evaluated by western blotting for CD9, an exosome marker, and the relative amount of exosomes to the whole proteins was calculated to the purity. Among the conditions examined, the maximum amount of exosomes was obtained under the conditions of centrifugal force of  $100,000 \times g$  or  $150,000 \times g$  for 120 or 180 minutes. The condition of  $100,000 \times g$  for 120 min was optimal to isolate the maximum amount of exosomes with little protein impurities from the bovine serum.

**Key words : bovine serum, exosomes, microRNA, ultracentrifugation, CD9.**

- 
1. Major in Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan
  2. Department of Genetic Engineering, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan
  3. Advanced Technology Research Institute, Kindai University, Wakayama 642-0017, Japan