2024 年度

創発的研究支援事業　年次報告書【公開版】

研究担当者	尾島　由紘
研究機関名	大阪公立大学
所属部署名	大学院工学研究科物質化学生命系専攻
役職名	准教授
研究課題名	微生物が産生する細胞外ナノ粒子の理解と応用
研究実施期間	2024 年 10 月 1 日～2025 年 3 月 31 日

研究成果の概要

本年度は，大腸菌の膜小胞生産機構の解明と，異なる大腸菌株の細胞への膜小胞の取り込みについて評価することを目的とした．生産機構の解明に関しては，全反射照明蛍光顕微鏡と Thin agar pad を用いてタイムラプス観察の基本条件は確立したが，フォーカスの維持が難しく高コントラストな像を得られなかった．今後は，所属機関に導入予定の超解像共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する予定である．一方，異なる大腸菌株への膜小胞の取り込み評価に関しては，膜小胞の回収方法として，従来法の超遠心分離を用いてプロバイオティクス株 EcN の膜小胞を回収すると，多くの夾雑タンパク質が確認された．そこで，サイズ排除クロマトグラフィーである qEV カラムを用いたところ，特に低分子側の夾雑タンパク質を高効率に除去できたため，今後は本手法で回収することにした．続いて，細胞への取り込み評価にあたり膜小胞を蛍光標識する必要が生じたため, P1 ファージを用いた形質導入法により，EcN の染色体上にλDE3 遺伝子を組み込み T7 発現系を構築した．続いて，膜小胞内部へのタンパク質移行を誘導するペプチド Vesicle nucleating peptide (VNp)と蛍光タンパク質 mNeonGreen の融合タンパク質を用い，EcN の蛍光標識された膜小胞を調整した．DLS の測定により，蛍光標識は膜小胞の平均直径に影響を与えないことが確認された．そこで，ドナーと同じ EcN と異種の K-12 系統である BW25113 株への膜小胞の取り込みをフローサイトメトリーで評価したところ，同種である EcN への取り込み量が BW25113 よりも約 5 倍多いことが明らかとなった．この結果は，細胞膜が類似している同種細胞のほうが膜小胞の取り込み効率が高く，取り込みに株間の選択性が生じることを意味しており，今後は選択的な物質輸送ツールとしての応用が期待できる．