

多機能化バイオベシクルの開発

岡 本 泰 典*

Development of Multifunctional Biologically-derived Vesicles

Yasunori OKAMOTO*

This project focuses on developing nano-factories that can synthesize drugs at disease sites using biologically-derived vesicles. We demonstrated that both membrane-displayed proteins and periplasmic proteins could be simultaneously expressed in *E. coli* cells, leading to multi-functionalized vesicles. Upon displaying histidine-tag on the vesicles, the corresponding vesicles can be collected by using magnetic beads bearing Ni-NTA moiety. Future work will apply this technology to incorporate various enzymes, including artificial enzymes, while further optimizing expression efficiency of target proteins through fine-tuning of translation and transcription controls.

1. 背景

適切なタイミングで患部に薬を正確に届けることができれば、投与量や投与回数を大幅に減らすことができる。このような時空間的な薬剤の体内分布の制御を可能とするために、基礎研究から臨床応用まで、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究が行われている。特定の細胞や組織を認識する抗体と薬を組み合わせた「抗体薬物複合体」のような薬剤そのものを患部へと送達する研究に加えて、疾患部位において薬剤をその場合合成するナノファクトリーの研究も進められている¹。このようなナノファクトリーは、酵素などの化学変換モジュールを中空の微粒子に封入することで得られる。内包する化学変換モジュールに非天然の化学変換能を有する合成触媒を使うことができれば、疾患部位で合成可能な分子のレパートリーは大きく拡張される。

我々のグループでは、天然の酵素には見られない化学変換能を有する人工酵素の開発を進めている(図1a)^{2,3}。人工酵素は合成触媒を宿主となるタンパク質の内部空間に導入することで構築され、得られる人工酵素は合成触媒の非天然の化学変換能とタンパク質(酵素)の高い反応選択性を併せ持つ。以前に我々は、上述したナノファクトリーの観点から、ポリマーソームなどの合成中空微粒子に人工酵素の内包を試みたことがある。しかし、内包率と再現性に問題があった。そこで、本研究において、我々は合成中空微粒子ではなく、微生物の産生するベシクルに注目した(図1b)⁴。このベシクルを産生する微生物に人工酵素の材料となるホストタンパク質を発現させ、その内部で人工酵素が構築できれば、人工酵素を内包するナノファクトリーの簡便な調製法となる。加えて、ペプチドやタンパク質を微生物の膜タンパク質に融合発現させ、ベシクル表面に提示できれば、細胞ターゲティング能などさまざまな機能の付与も可能となる(図1b)。そこで、人工酵素内包ナノファクトリーの開発に向けた基盤技術の確立をめざし、本研究では微生物由来のベシクルに複数の任意のタンパク質を効率的に導入する手法の開発に取り組んだ。

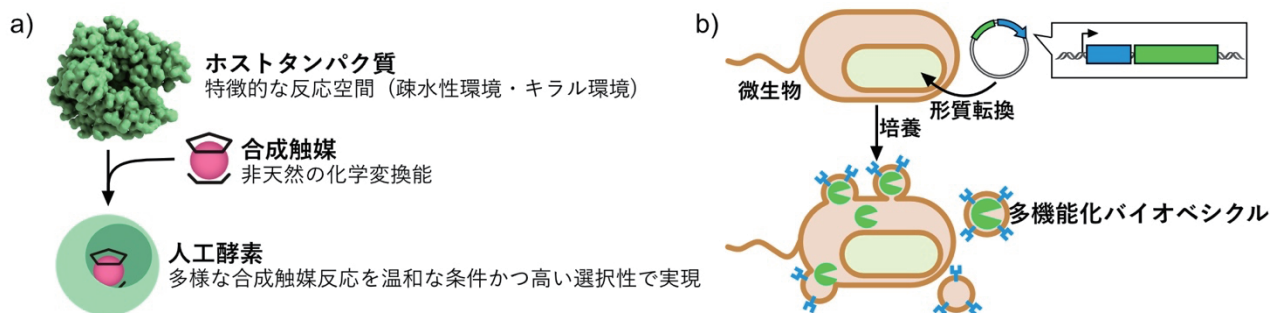


図1 (a) 人工酵素の構築法, (b) 微生物の産生するベシクル。

2. 結果と考察

これまでの研究から、次の3点を確認している。① 大腸菌由来の膜タンパク質の特定領域に目的タンパク質を融合発現させることで、目的タンパク質を大腸菌外膜表面に提示可能である。② ペリプラズム移行シグナル配列と融合発現することで、目的とするタンパク質をベシクル内部へと導入可能である。③ これら二つの発現系を単一プラスミド上に構築することにより、大腸菌の外膜とペリプラズムに異なる二種類のタンパク質を同時発現できる。しかしながら、初期検討の段階では、大腸菌において、両方のタンパク質の発現量のバランスがとれていないことがわかっていて、そのため、両方のタンパク質を有するベシクル、double positive ベシクルの産生量が少ないという課題があった。

そこで、各種培養条件を検討したところ、外膜に提示するタンパク質とペリプラズムに発現させるタンパク質は、それぞれ異なる至適温度条件で発現することが分かった。具体的には、今回用いた外膜側の対象タンパク質は37℃での培養において、効率的に発現されたのに対して、ペリプラズム側の目的タンパク質は16℃における培養でその発現量が最大化されるという相反する条件設定が必要であることが示された。そこで、外膜側タンパク質の発現に最適な温度条件を維持しながら、同時にペリプラズム側のタンパク質の発現量を向上させるため、複数のペリプラズム移行シグナル配列について比較検討した。その結果、赤色蛍光タンパク質においてはOmpA ペリプラズム移行シグナル配列が比較的良好な結果を与えた。一方で、緑色蛍光タンパク質では他のペリプラズム移行シグナル配列が適しているようであり、封入するタンパク質に合わせて、ペリプラズム移行シグナル配列の検討が必要となることがわかった。

また、外膜に提示するタンパク質にHistidine-tagを融合することで、Ni-NTA(nickel-nitrilotriacetic acid)が修飾された磁性体粒子にHistidine-tagを有するベシクルが結合可能であることがわかった(図2)。イミダゾールを含む緩衝液で、この磁性体粒子を処理することによって、ベシクルを回収することができるため、目的とするタンパク質をもつベシクルの簡便な回収および濃縮法となる可能性がある。

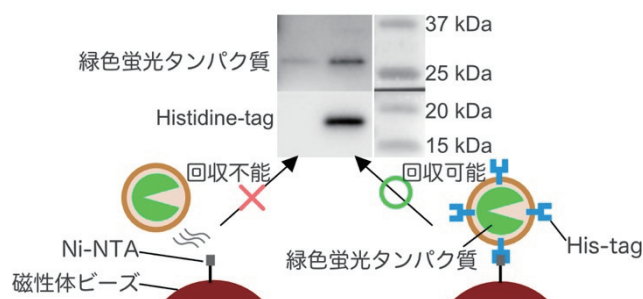


図2 Ni-NTA 修飾磁性体粒子を用いて回収したバイオペシクルのウェスタンブロット。

3. 今後の展望

本研究期間において、目的タンパク質の構造・特性に応じて最適なペリプラズム移行シグナル配列を選択することで、多様なタンパク質をベシクルに内包可能であることが実証された。今後は、この技術基盤を応用し、各種酵素や人工酵素の導入へと展開する。

また、シグナル配列を変えることで一定の改善が達成されたものの、double positive ベシクルの産生効率には依然として向上の余地がある。この課題に対しては、外膜側およびペリプラズム側のタンパク質の発現量や発現のタイミングの精密制御が必要である。具体的には、リボソーム結合部位 (RBS) 配列の微調整による翻訳効率の最適化などを進める。

REFERENCES

- 1) 例として, Li, *et al.*, *Nano Lett.*, **17** (2017) 6983. など
- 2) Schwizer, *et al.*, *Chem. Rev.*, **118** (2018) 142.
- 3) Okamoto, *et al.*, *Nat. Commun.*, **9** (2018) 1943.
- 4) Toyofuku, *et al.*, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **226** (2015) 65.