

# 枯草菌胞子を用いたバイオリアクターの開発

今村 大輔  
法政大学 生命科学部

## 研究成果

枯草菌胞子の表面に酵素などの有用タンパク質を提示し、バイオリアクターなどに利用できるシステムを確立するため、まず胞子タンパク質の位置を解析し、胞子の最も外側に位置するタンパク質を探索した。次に、それらのタンパク質に融合された緑色蛍光タンパク質（GFP）の蛍光を指標として、その胞子表面への提示量や安定性を評価した。その結果、室温と4℃、水中と乾燥状態のいずれの条件でも、3週間以上に渡って安定に外来タンパク質を提示することができる胞子タンパク質を4つ見出した。さらに、これらの融合タンパク質は、胞子の発芽能を欠損させても安定性に影響を及ぼさなかったことから、バイオリアクターとして用いる上で、有望なアンカータンパク質であることが示唆された。

## 研究の目的

固体粒子表面に任意のタンパク質やペプチドを提示することは、医学、薬学、環境浄化、発酵産業、物質生産など様々な分野において有用である。これまでも微生物、ほ乳類、昆虫などの細胞の表面にタンパク質を提示する試みはあったが、本研究では、枯草菌胞子の表面に任意のタンパク質を提示するシステムの確立を目指す。枯草菌胞子はタンパク質提示粒子として様々な利点がある。まず、1) 枯草菌の亜種に納豆菌があるように、人体に無害である。2) 枯草菌は容易、安価に培養でき、産業化の際には、納豆菌のノウハウを利用できる。3) 枯草菌の胞子は様々な環境に耐性があり安定であるため、過酷な環境での利用や、発展途上国などへの輸送にも耐えられる。また、酵素などは遊離の状態よりも支持体に付けてある方が安定であることが知られている。4) 細胞内で発現したタンパク質を細胞外へ提示するためには、細胞膜通過の効率、膜への結合、膜通過後のリフォールディングなどの条件をクリアしなくてはならない。しかし、枯草菌のスポアコートタンパク質は Mother cell で発現し forespore 表面に沈着するため (Fig. 1)、細胞膜を通過する必要がなく、より適用範囲は広い。このような利点から、枯草菌胞子を用いたタンパク質提示システムの確立を目指す。本課題では、外来タンパク質を胞子表面に提示するためのアンカーとして最も適した胞子タンパク質を決定することを目的とする。

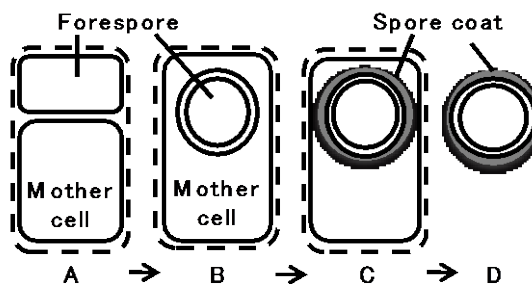
## 方法

最初に、70種類以上あるスポアコートタンパク質の中でどれが胞子の表面に局在しているのかを明らかにする必要がある (Fig. 1)。しかし、スポアコート内におけるそれぞれのタンパク質の位置は、免疫電子顕微鏡など特殊な方法を用いなくては解析できず、ほとんど明らかになっていなかった。そこで私は、スポアコートタンパク質に GFP を融合し、蛍光顕微鏡で撮影した上で、画像解析と統計処理を行うことにより、融合タンパク質がスポアコート内のどのくらい深い位置にあるのか解析する方法を開発した<sup>1)</sup>。そして、これに

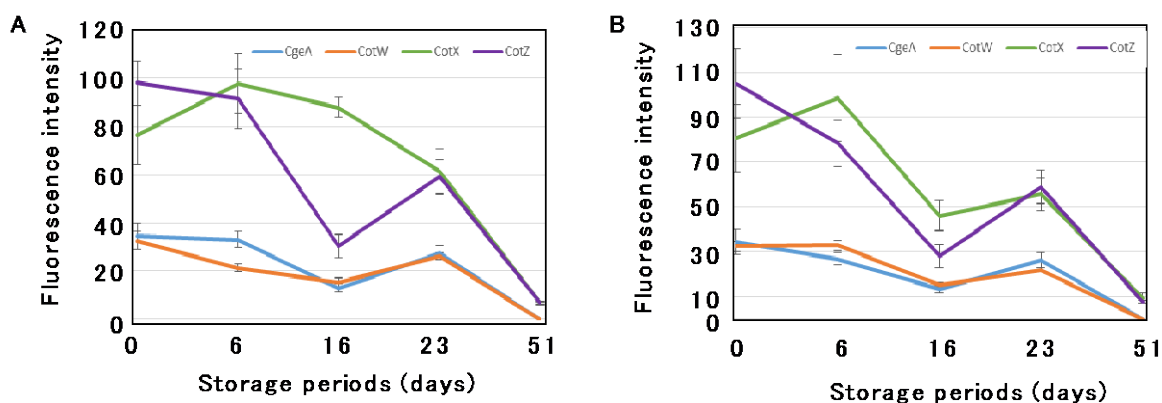
より、それまで知られていなかった胞子の最外層を発見した<sup>2,3)</sup>。そこでこの手法を用いて、様々なスポアコートタンパク質の局在を解析し、胞子の最外層に局在し、外来タンパク質の提示に適した候補タンパク質をスクリーニングした。次に、これらのタンパク質に融合された GFP の蛍光を指標として、提示量や安定性を評価した。また、胞子をバイオリアクターとして利用する場合、基質が栄養源となり胞子が発芽してしまうと粒子ではなくなってしまうため望ましくない。そこで、発芽能を欠損させた胞子でも提示された GFP の安定性を評価することにより、アンカーとして最も有望な胞子タンパク質を決定した。

## 結果

枯草菌胞子に局在するタンパク質の位置解析の結果、最も外側に位置していると考えられるタンパク質を6個ピックアップした。次に、それらのタンパク質に融合された蛍光タンパク質の安定性を評価した。その結果、CgeA、CotW、CotX、CotZの4つのタンパク質によって胞子表面に提示された蛍光タンパク質は、室温や4℃、水中や乾燥状態など、いずれの条件下でも、胞子表面に安定であった。Fig. 2に乾燥胞子の結果の例を示す。アンカータンパク質の種類により、測定開始時の蛍光強度に差があるものの、23日間の保管後も全てのタンパク質で開始時の半分以上の蛍光強度を維持していた。したがって、これらのタンパク質は少なくとも3週間以上に渡って外来タンパク質を胞子表面に安定に提示できることが示された。また、4℃と室温で大きな違いが現れなかったことから、胞子表面に提示されたタンパク質は、



**Fig. 1 Endospore formation in *Bacillus subtilis*.** Sporulation of *B. subtilis* is initiated in response to nutrient limitations. The first morphological change in sporulation is the appearance of an asymmetrically positioned septum that divides the cell into a larger mother cell and a smaller forespore (A). Next, the mother cell membrane migrates around the forespore membrane and pinch off the forespore within the mother cell (B). Over 70 proteins are expressed in the mother cell and assemble on the forespore to form the spore coat (C). Matured spore is released upon lysis of the mother cell (D).



**Fig. 2 Stability of GFP displayed on the spore surface during long term storage.**

GFP was displayed on the spore by fusing to the indicated spore surface proteins and purified spores were dried and stored at room temperature (A) or 4 °C (B). Fluorescence intensities were measured at indicated time points. The mean and standard deviation are shown.

必ずしも低温で維持されなくても安定であることが示唆された。

さらに、本システムをバイオリクターなどに利用する場合、基質が栄養源であると、孢子が発芽して粒子としての孢子を失ってしまう可能性が考えられる。そこで、発芽能を欠損させた孢子でも安定に外来タンパク質を提示できるかを検証したところ、発芽に必要な細胞壁分解酵素をコードしている遺伝子 *cwlD* の破壊株でも、野生株と同様に数週間は安定に提示できることが確認された。

以上の結果より、今回、見出された4つのタンパク質は、孢子表面に外来タンパク質を長期間、安定に提示できることが明らかになり、バイオリクターとして利用するためのアンカータンパク質として、非常に有望であることが示された。

## 結論

枯草菌孢子の表面に外来タンパク質を室温で、長期間に渡って安定に提示することができるタンパク質を4種類特定した。これらのタンパク質は、孢子をバイオリクターとして用いる上で、非常に有望なアンカーの候補となる。

## 文献

- 1) Imamura, D., Kuwana, R., Takamatsu, H. and Watabe, K. (2010) Localization of proteins to different layers and regions of *Bacillus subtilis* spore coats. *J. Bacteriol.* **192**:518-524.
- 2) Imamura, D., Kuwana, R., Takamatsu, H., and Watabe, K. (2011) Proteins involved in formation of the outermost layer of *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* **193**:4075-4080.
- 3) Shuster, B. *et al.* (2019) Expansion of the Spore Surface Polysaccharide Layer in *Bacillus subtilis* by Deletion of Genes Encoding Glycosyltransferases and Glucose Modification Enzymes. *J. Bacteriol.* **201**:e00321-19.