

「細菌集合体における膜小胞分泌の分子機構解明」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：田代陽介

1. 研究のねらい

多くの病原細菌は細胞外に直径 20～200 nm の膜小胞を放出しており、膜小胞は動物・植物等の細胞へ病原因子を運搬する「ミサイル」的機能を有している。そのため、細菌感染制御のためには膜小胞の形成機序の解明が必須である。

病原細菌はバイオフィーム(微生物とその分泌物から構成される構造体)を形成して上皮細胞に固着することが知られている。細菌が単独で生息する浮遊状態とは異なり、バイオフィームは個々の細胞の表現型が多様な細菌集合体であり、まるで多細胞生物のような機能を有している。膜小胞はバイオフィーム状態で多量に形成されることが知られているが、膜小胞の形成機構やその宿主細胞への病原性はこれまで扱いやすい浮遊細菌の膜小胞が研究対象となっていた。一方、研究提案者らは、日和見感染細菌である緑膿菌をモデル細菌として用いて、膜小胞は常に一様ではなく環境条件により異なる特性の膜小胞が放出されることを発見した。さらに、バイオフィーム状態で放出された膜小胞は、特性だけでなくその放出機構も浮遊状態とは異なる可能性が示された。以上のことから、微生物による膜小胞を介した感染メカニズムについても既往の知見を一新する必要があると考えられた。つまり、浮遊状態をベースとした従来の膜小胞研究では細菌感染の実像は捉えられておらず、難治性感染症の克服を目指すためには、宿主細胞上でバイオフィームを形成し“感染状態”における『真の膜小胞』の形成機構の理解が重要である。

そこで本研究では、宿主感染状態であるバイオフィームにおける膜小胞形成の分子機構解明を達成目標とした。そして難治性細菌感染症の治癒に向けた病原性細菌の膜小胞を介した感染機構の包括的理解とその制御法の確立を最終目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究ではモデル微生物として日和見感染菌として知られる緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株を用いて、バイオフィームにおける膜小胞形成誘発機構の解明を目指した。PAO1 株のバイオフィーム状態では浮遊状態と比べて膜小胞形成の顕著な増加が見られ、バイオフィーム内部では細菌の細胞外膜の湾曲により膜小胞が放出されており、膜小胞が細胞外多糖のような繊維状物質と絡み合いバイオフィーム構成成分となっていることが電子顕微鏡観察により示された。トランスポゾンを導入して変異株ライブラリーを構築し、バイオフィーム状態での膜小胞形成誘発に関与する因子の探索を行ったところ、物質付着に関わるべん毛運動、凝集形成に関わる細胞外多糖合成に関わる遺伝子欠損株で膜小胞形成が低下することが示された。また、他の遺伝子欠損株においては膜透過性に変動が見られた。

さらにバイオフィーム内では酸化ストレスが生じ、膜小胞形成を促進するプロセスが示された。一方、膜小胞のタンパク質組成を解析すると、浮遊・バイオフィーム両培養条件の膜小胞では共通するタンパク質は少ないことが示された。さらに膜小胞一粒子ごとの表面組成を解析してみると、バイオフィーム状態の膜小胞は比較的均一な組成であるのに対し、浮遊状態の膜小胞は不均一であった。以上のことから、バイオフィーム状態では膜透過性向上と酸化ストレスが比較的均一な膜小胞の過剰生産を誘発していることが示された。

(2) 詳細

研究テーマ A 「バイオフィームにおける膜小胞形成誘発因子の特定」

本研究ではモデル微生物として日和見感染菌として知られる緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株を用いて、バイオフィームにおける膜小胞形成誘発機構の解明を目指した。PAO1 を静置培養するとバイオフィームが形成され、細菌が浮遊状態となる振盪培養に比べて膜小胞形成増加が見られた。そこで走査電子顕微鏡観察を行った結果、PAO1 バイオフィーム内では細菌同士が多糖などの繊維状物質により結合することで集合体を形成しており、膜小胞は繊維状物質に絡まりバイオフィームの構成成分となっていることが示された。

また、バイオフィーム内での膜小胞形成細菌の細胞内部構造を調べるために、PAO1 バイオフィームの急速凍結レプリカ顕微鏡観察を行った。その結果、外膜と内膜との間隙が生じ、外膜が撓んでいる様子が観察された。一方、このような外膜構造の変化は浮遊状態の細胞やバイオフィーム培養条件初期の細胞には見られなかった。以上の結果から、バイオフィーム状態では何らかの要因で外膜の湾曲が生じており、それが膜小胞過剰形成の一因となっていると考えられた。

次に、PAO1 株を用いて、バイオフィーム状態で膜小胞形成に関与する因子の探索を行った。PAO1 株にトランスポゾンを導入して変異株ライブラリーを構築し、各変異株を対象に膜小胞形成を解析したところ、野生株と比較して 1/3 以下の形成量を示した膜小胞低生産株を取得した。その変異箇所を解析したところ、べん毛運動形成やバイオフィーム構成多糖合成に関わる遺伝子の変異株が存在した。これらの遺伝子欠損株ではバイオフィーム形成能が低下しており、バイオフィーム形成低下が膜小胞形成の低下に働いていると考えられた。

また、他にもバイオフィーム維持に関与する遺伝子の変異株で膜小胞形成低下が確認され、野生株に比べて膜透過性に変動が見られた。以上の結果から、バイオフィームのライフサイクルにおける付着・凝集などのステップに関わる因子が膜小胞形成誘発に関与することが明らかとなった。

研究テーマ B 「バイオフィームで発生する酸化ストレスの膜小胞形成への影響解析」

バイオフィーム状態では浮遊状態とは異なる環境であるため、その環境の変化と膜小胞形成との関係を調べた。バイオフィーム状態では、膜小胞形成量とともに過酸化水素生成量が向上していた。また、過酸化水素を外部添加すると膜小胞形成量が増加したことから、緑膿菌バイオフィーム内における膜小胞形成誘発の一因として、酸化ストレスが示唆された。

酸化ストレスが生じると外膜タンパク質のフォールディングが不完全となり、不要タンパク質のペリプラズム空間への蓄積が膜小胞形成を促進することが広く知られている (Macdonald

& Kuehn 2013 J Bacteriol 195:2971)。本実験結果では、そのような酸化ストレスによる膜小胞形成増大がバイオフィームで起こっており、その要因として色素合成の関与が示された。

研究テーマ C 「細菌が放出する膜小胞の多様性解析」

浮遊状態、バイオフィーム状態における膜小胞の特性・組成変化の理解を目指した。膜小胞のサイズを透過電子顕微鏡観察、ならびにナノ粒子トラッキング解析で調べたところ、両培養条件において顕著な差は見られなかった。また、各培養条件における培養液から膜小胞を抽出し、タンパク質組成を質量分析により解析した。膜貫通型の外膜タンパク質は両条件の膜小胞に含有されていたものの、浮遊状態の膜小胞には細胞外分泌タンパク質が、バイオフィーム状態の膜小胞にはリポタンパク質が多く存在することが示された。以上のことから、浮遊状態とバイオフィーム状態では異なるタンパク質組成の膜小胞が形成されていることが示された。

さらに浮遊状態とバイオフィーム状態で形成される膜小胞の一粒子ごとの組成・特性を解析した。その結果、膜小胞形成量が高いバイオフィーム状態に比べて、浮遊状態の膜小胞の方が表面特性が多様であることが示された。バイオフィーム状態では比較的均一な組成の膜小胞が大量に生産されているのに対し、浮遊状態では様々な因子が形成に関与して不均一な膜小胞が放出される可能性が示された。

3. 今後の展開

本研究で得られた知見を生かして、細菌膜小胞を用いた以下の応用研究へと展開する。

- 1) 細菌由来膜小胞を用いたワクチン開発
- 2) 膜小胞を介した遺伝子導入法の開発
- 3) 細菌由来膜小胞を用いたがん治療法開発

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

従来の目的であったバイオフィームにおける膜小胞形成誘発機構解明に関しては、その機構詳細を明らかにするための十分な実験結果が得られた。

【研究実施体制】

本テーマに十分な人的要因を確保でき、実験担当人数的には問題はなかった。研究費執行に関しては追加予算や解析バトル等の支援があり問題はなかった。さきがけ研究者との共同研究を活発に行うことができ、今後の研究の発展に大きく寄与した。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

基礎研究であったため、直接的な波及効果は大きくはないが、得られた成果は科学技術創出に向けた応用研究の礎を築いたため、今後社会・経済への波及効果が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

<p>1. Aktar S, Okamoto Y, Ueno S, Tahara YO, Imaizumi M, Shintani M, Miyata M, Futamata H, Nojiri H, <u>Tashiro Y</u>. Incorporation of plasmid DNA into bacterial membrane vesicles by peptidoglycan defects in <i>Escherichia coli</i>. Frontiers in Microbiology 12:747606 (2021)</p>
<p>細菌の膜小胞は遺伝子水平伝播の媒体として利用されているものの、グラム陰性菌ではどのようにして DNA が膜小胞内に封入されるのかは大きな謎であった。本研究では、細胞壁分解が進むと膜小胞内の DNA 濃度が向上することを見出した。また、膜小胞内に DNA が含まれる要因として、i) 細胞壁分解等の表層ストレスによる内膜透過性の向上、ii) 内膜が突出して二重膜小胞を形成、の 2 つの機構を明らかにした。</p>
<p>2. Nakamichi N, Moriuchi R, Dohra H, Futamata H, <u>Tashiro Y</u>. Complete genome sequence of <i>Buttiauxella agrestis</i> DSM 9389. Microbiology Resource Announcements 10:e00301-21 (2021)</p>
<p><i>Buttiauxella</i> 属細菌は膜小胞を過剰に形成する細菌であるが、各 <i>Buttiauxella</i> 属細菌のゲノム類似度は明らかではなかった。当該研究では、<i>Buttiauxella</i> 属細菌の全ゲノムを解読し、その特徴をまとめた。また、ゲノムが既に明らかとなっている <i>Buttiauxella</i> 属細菌とのゲノム類似度を解析し、膜小胞形成に寄与する遺伝子を探索するための情報を整備した。</p>
<p>3. Takaki K, Tahara YO, Nakamichi N, Hasegawa Y, Shintani M, Ohkuma M, Miyata M, Futamata H, <u>Tashiro Y</u>. Multilamellar and multivesicular outer membrane vesicles produced by a <i>Buttiauxella agrestis tolB</i> mutant. Applied and Environmental Microbiology 86:e01131-20 (2020)</p>
<p>本研究では、細菌から放出される膜小胞の形状が多様であることを <i>Buttiauxella</i> 属細菌を用いて示した。また、今まで報告例のなかった多重膜小胞や多胞膜小胞が形成されることを見出し、急速凍結切断レプリカ電子顕微鏡を用いた細菌の切断面観察により、多重膜小胞・多胞膜小胞の形成プロセスを提唱した。</p>

(2) 特許出願

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

- ・ 日本農芸化学奨励賞 (2021 年 3 月)
- ・ 東海化学工業会奨励賞 (2020 年 5 月)

英文総説

- ・ Tashiro Y. Bacterial membrane vesicles with multiple lipid bilayers: vesicles harboring organelle-like structures. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 86:967-973 (2022)

著書

- ・ 田代陽介 「細菌における細胞外小胞の形成機構と宿主細胞との相互作用」実験医学増刊 EVs 細胞外小胞の生物学 中野明彦、吉森 保、華山力成／編 39: 126 (2021)

