

# 細菌が放出する細胞外膜小胞の機能および形成機構に関する研究

豊福 雅典 (筑波大学 生命環境系)

toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp

ほとんどの細菌は細胞外に膜で構成される微小粒子(メンブレンベシクル: MV)を放出することが明らかとなっている。近年では、MVの機能が次々と解明され、その研究分野は急速な発展を遂げている。その一方で、MVの基礎的な理解やその応用に際して根幹を成す、MVの形成機構については理解が進んでいなかった。本稿ではMVの形成機構を含めて、これまでに得られた成果を紹介する。

## はじめに

MVはおよそ直径40から400 nmの細胞外膜小胞であり、細菌同士の膜タンパク質の交換や遺伝子水平伝播に関わるほか、細胞膜をターゲットにした抗生物質やファージのおとりとして働くことが明らかにされている<sup>1)</sup>。さらには、病原性細菌において、毒素を宿主細胞に運搬する役割を持ち、免疫誘導性を利用したワクチン開発も盛んに行われている。

## MVの微生物間コミュニケーションへの関与

近年に入り、細菌どうしがシグナル化合物を介してコミュニケーションを行い、遺伝子発現を集団で調節していることが明らかとなってきた<sup>2)</sup>。これまでの研究で、微生物間コミュニケーションは二次代謝の制御に関わるとされていたが、我々は緑膿菌を用いた研究において、一次代謝である脱窒(嫌気環境下での呼吸様式の一つ)が制御されることを明らかにした<sup>3),4),5)</sup>。脱窒は地球上の窒素循環において重要な役割を果たし、水処理にも利用されている。

微生物間コミュニケーションで最も研究されているシグナル化合物の一つとして、一部のグラム陰性菌が用いるアシル化ホモセリンラクトン(AHL)類が挙げられる。AHLはラクトン環に側鎖のアシル基が結合した構造をもつが、アシル基が長くなるにつれ、疎水性が高くなる。疎水性の高い長鎖AHLを産生する細菌は多く報告されているが、長鎖AHLが水に溶解しづらいために、どのように細胞間で長鎖AHLが伝達されるのかについては、長い間疑問となっていた。環境浄化細菌の一種である *Paracoccus denitrificans* は、シグナル化合物として、長鎖AHLの一種であるC16-HSLを産生する。過去の知見によりC16-HSLが*P. denitrificans*の細胞膜に蓄積すると考えられた<sup>6)</sup>。そこで我々は膜から生産されるMVに着目し、MVによってC16-HSLが運搬されているのではないかと考えた。その結果、*P. denitrificans*のMVにはC16-HSLが濃縮されていることが明らかとなった<sup>7),8),9)</sup>。定量的な解析の結果、MV1粒子には遺伝子発現を制御するのに必要な閾値濃度以上のシグナル化合物が含まれることが明らかとなった。従来の微生物間コミュニケーションでは、シグナル化合物が周囲に拡散し、遺伝子発現を同

調させると考えられていたのに対し、本知見は、シグナル化合物が MV に濃縮されて、とびとびに伝わることを示唆する。従来とは異なる微生物間コミュニケーション様式であることから、これをバイナリーシグナリングと名付けた<sup>7)</sup> (図 1)。

### 溶菌を伴う MV 形成機構

細菌は構造上、大腸菌のように内膜と外膜を有するグラム陰性菌

と、枯草菌のように、外膜の外側に厚いペプチドグリカン層を有するグラム陽性菌に大別できる。グラム陰性菌においては、外膜が外側にたわむ形で MV が形成される **blebbing** と呼ばれる機構が知られていた。その一方で、DNA など、細胞質内に局在する生体分子が MV に内包されることが報告されており、**blebbing** では細胞質内の生体分子が内膜をどのように通過するのかを説明できずにいた。我々は、MV 形成機構について新たに知見を得るために、緑膿菌を用いて、MV が形成される過程を超解像顕微鏡によるライブセルイメージングで解析した。その結果、細胞が破裂し、放出された膜断片が再会合することによって MV が形成される MV 形成経路が明らかとなり、これを、**explosive cell lysis** と名付けた<sup>10)</sup>。本機構のメカニズムを解析したところ、細胞壁分解酵素であるエンドリシンが関与することを明らかにした。これまでの通説では、MV は細胞が生きのまま放出するとされてきたが、本発見はそれを覆すことになった。

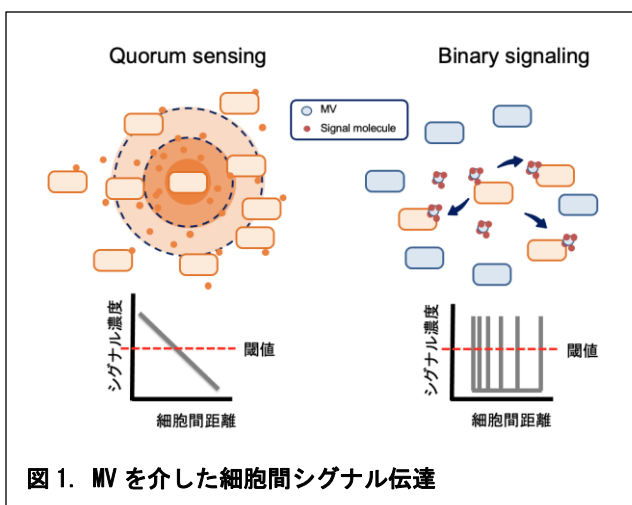


図 1. MV を介した細胞間シグナル伝達

### エンドリシンによるグラム陽性菌の MV 形成

エンドリシンは細菌間で極めて保存性が高いタンパク質であり、ファージを介して獲得することも可能である。グラム陽性菌においては、膜の外側が厚い細胞壁で覆われているために、MV がどのように放出されるかについての知見は皆無であった。グラム陽性菌でも細胞壁の分解が鍵なのではないかと考え、再びエンドリシンに着目した。そこで、グラム陽性菌のモデル細菌である枯草菌を用いて研究

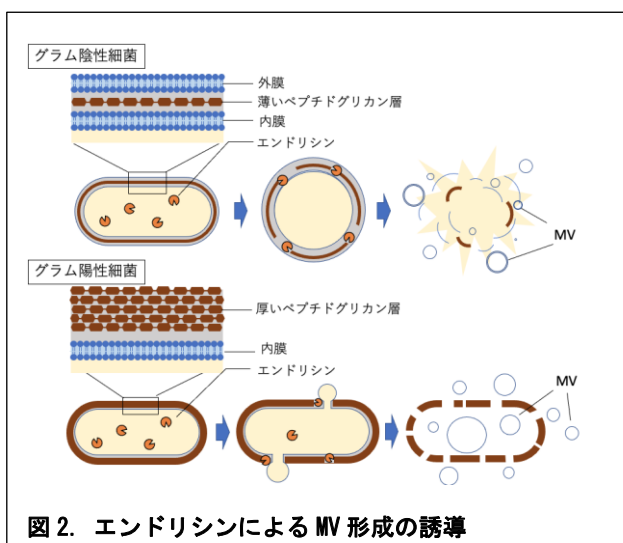


図 2. エンドリシンによる MV 形成の誘導

を行った結果、エンドリシンの誘導によって MV 産生量が上昇することが明らかとなった<sup>11)</sup>。ライブセルイメージングによってその過程を解析した結果、緑膿菌とは異なり、枯草菌が形を保ったまま MV が形成される様子が観察された。そこで、クライオ電子線トモグラフィーによって、より微細に構造を解析したところ、細胞壁に空いた穴から膜が吐出する形で MV が形成されることが明らかとなった。本機構も細胞死を伴うことから **bubbling cell death** を名付けた(図 2)。

### **MV の多様性**

MV の新たな生産機構を解明したことにより、細菌が異なる MV 形成経路を有していることが示された。その生産経路に応じて MV の中身、しいては機能が変換することが考えられる。そこで細胞が生きたまま放出するとされていた、MV を定義し直し、MV の多様性について提唱した<sup>12)</sup>。また、その実証の一つとして、細菌の中で最も複雑な細胞外皮構造を持つミコール酸含有細菌の仲間である、コリネ型細菌を用いて研究を行った<sup>13)</sup>。本菌はグラム陽性菌であるが、厚い細胞壁の外側に外膜ともいえる、ミコール酸層をもつ。また、グルタミン酸などの生産で工業的にも利用されている。過去の知見により、ビオチン制限やペニシリン処理により、膜がゆるくなると知られていたため、これらをヒントにして、本菌を異なる環境下で培養したところ、環境に応じた MV 形成機構が存在することが明らかとなった。ライブセルイメージングや脂肪酸組成の解析により、コリネ型細菌はビオチン制限下ではミコール酸層を主成分とする MV を形成し、ペニシリン存在下では、細胞の極からカルジオリピンを多く含んだ MV を形成することが明らかとなった。また、本菌においても DNA ストレス存在下でエンドリシンの働きによって MV が形成されることが明らかとなった。

### **今後の展望**

細菌は比較的単純な構造でありながら、環境に応じた複数の MV 形成機構が存在することが明らかとなった。異なる形成機構が MV の機能の多様性に関わっている可能性がある。今後は MV がどのように細胞に作用しているのか、その詳細を明らかにし、MV の応用にも繋げたい。

### **謝辞**

本賞の受賞にあたっては、公益財団法人 日本農芸化学会よりご推薦を賜りました。松山旭会長をはじめ、関係者の先生方に心より感謝申し上げます。筑波大学の野村暢彦教授には学生時代から継続した多くのご指導を賜り、重ねて御礼申し上げます。また、チューリッヒ大学の Leo Eberl 教授にはポストドク時代からサポートいただき、心より感謝いたします。最後に、ここには記述しきれませんが、国内外の共同研究者や研究を支えている学生、スタッフの皆様と家族に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Toyofuku, M., Tashiro, Y., Hasegawa, Y., Kurosawa, M. and Nomura, N.: *Advances in Colloid Interface Science* 226: 65-77 (2015).
- 2) Fuqua, W.C., Winans, S.C. & Greenberg, E.P.: *Journal of Bacteriology* 176:269-275 (1994).
- 3) Toyofuku M., Nomura N., Fujii T., Takaya N., Maseda H., Sawada I., Nakajima T., Uchiyama H.: *Journal of Bacteriology* 189:4969-4972 (2007).
- 4) Toyofuku M., Nomura N., Kuno E., Tashiro Y., Nakajima T., Uchiyama H.: *Journal of Bacteriology* 190:7947-7956 (2008).
- 5) Toyofuku M., Nakajima-Kambe T., Uchiyama H., Nomura N.: *Microbes and Environments* 25:1-7, 2010.
- 6) Schaefer, A.L., Taylor, T.A., Beatty, J.T. and Greenberg, E.P.: *Journal of Bacteriology* 184:6515-6521 (2002).
- 7) Toyofuku M., Morinaga K., Hashimoto Y., Uhl J., Shimamura H., Inaba H., Schmitt-Kopplin P., Eberl L., Nomura N.: *The ISME Journal* 11:1504-1509 (2017).
- 8) Morinaga, K., Yamamoto, T., Nomura, N. and Toyofuku, M.: *Environmental Microbiology Reports* 10:651-654 (2018).
- 9) Morinaga, K., Nagakubo, T., Nomura, N. and Toyofuku, M.: *Environmental microbiology reports* 12: 355-360 (2020).
- 10) Turnbull L., Toyofuku M., Hynen A. L., Kurosawa M., Pessi G., Petty N. K., Osvath S. R., Cárcamo-Oyarce G., Gloag E. S., Shimon R., Omasits U., Ito S., Yap X., Monahan L. G., Cavaliere R., Ahrens C. H., Charles I. G., Nomura N., Eberl L. and Whitchurch C. B.: *Nature Communications* 7:11220 (2016).
- 11) Toyofuku M., Cárcamo-Oyarce G., Yamamoto T., Eisenstein F., Hsiao C., Kurosawa M., Gademann K., Pilhofer M., Nomura N., and Eberl L.: *Nature Communications* 8:481 (2017).
- 12) Toyofuku, M., Nomura, N. and Eberl, L.: *Nature Reviews Microbiology* 17: 13-24 (2019).
- 13) Nagakubo, T., Tahara, Y.O., Miyata, M., Nomura, N. and Toyofuku, M.: *iScience* 24: 102015 (2021).