

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25701012

研究課題名(和文)ベシクルを介した微生物間ネットワークの解明とそのデザイン方法の創出

研究課題名(英文)Bacterial networking through membrane vesicles

研究代表者

豊福 雅典 (TOYOFUKU, Masanori)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：30644827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年細菌は膜で構成された袋状の構造体、メンブレンベシクル(MV)を細胞外に放出することが明らかとなっている。MVはその内容物を周囲の細胞に受け渡すことができるため、細胞間相互作用において重要な役割を担う。本研究では、MV生産菌を多数同定し、そのMV生産機構、MVの機能、またMVの伝達について解析し、成果を得た。特にMVの新規生産機構を発見した点と細胞間情報伝達への関与を明らかにして新たなモデルを提唱したことが大きな成果である。

研究成果の概要(英文)：Most bacteria release membrane vesicles (MVs) to the environment. These MVs are reported to have various functions that are important to the biological system, while they are not fully understood. During this project we have revealed a novel mechanism of how these MVs are released from the cell. Furthermore, we found that MVs can carry hydrophobic cell-cell communication signals (long chain AHLs), that will trigger the gene expression of the MV receiving cells. MVs showed some tendency to attach to the same species. Our data will allow us to understand the MV driven bacterial interactions and could also serve as a platform for nanotechnology.

研究分野：微生物学

キーワード：ベシクル 細菌間情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

我々が言葉を話すように、多くの細菌は低分子化合物を用いて、周囲とコミュニケーションをとっている。そして、細菌はコミュニケーションを介して集団としての性質を制御することが知られている。例えば、バイオフィームと呼ばれる細菌が密集した高次構造体の形成には、細菌間コミュニケーションが関与している。バイオフィームは環境浄化やヒトの健康まで我々の生活に良い面でも悪い面でも密接に関係しており、その制御方法の確立は社会に大きく貢献する。バイオフィーム形成に関わる細菌間コミュニケーションはバイオフィーム制御の有効な手立てとして注目されているが、実環境中において実際に細菌がどのように細菌間でコミュニケーションをとっているのか、すなわち、低分子化合物を介してどのようにシグナル伝達を行なっているのか、については多くの部分が未解明である。特に疎水性の高いシグナル物質については水溶液中をどのように伝わっていくのかが解明されていない。細菌間コミュニケーションをより効果的に、微生物制御に利用するためには、実環境での細菌間コミュニケーションの理解は欠かせない。

ここで注目すべき研究例として、シグナル物質がメンブレンベシクル(MV)によって運搬されるという報告がある(Mashburn et al., Nature, 2005)。しかしながら、このような報告例は1件のみで、その普遍性については検証されていなかった。MVは膜で構成された数十から百ナノメートルの球状の構造体(膜小胞)で、細胞間での物質のやりとりに関与していることが示されている。このようなMVは多くの細菌で生産され、シグナル伝達に関与している可能性が高い。先行研究において我々は、バイオフィーム形成に必須な細胞外マトリックス中には、MVが多く存在することも見出しており(Toyofuku et al., J. Proteome Res. 2012)、バイオフィーム制御の新たなターゲットになりうることを示した。MVは細胞膜で構成されるために、物性をデザインし、さらには、新たな機能を加えることも可能である。従って、MV研究は実環境での細菌間コミュニケーション、相互作用の理解へ繋がる可能性がある上に、応用利用価値も高い。しかしながら、MVについての基礎的な知見は極めて乏しいのが現状であった。細胞間コミュニケーションや細胞間相互作用を理解する側面からも、MVを介した微生物間ネットワークを明らかにしていく必要がある。

## 2. 研究の目的

MVは微生物間相互作用で重要な役割を担っている可能性が高く、シグナル物質の運搬体として微生物制御への利用も期待されるが、多くの部分が未解明である。そこで、本研究ではMVを介した微生物間相互作用を解明し、MV利用のための基盤を作

ることを目的とした。具体的には、MV生産菌を探索し、MV形成機構や機能、細胞間コミュニケーションへの関与を解析する。さらに、MV受容機構を解明するために、MV受容パターンを解析して、MVを介した細胞間ネットワークを明らかにしていく。これらの知見をもとにMV形成や受容菌への付着、融合機構理解についての知見を得る。さらにはその知見を応用することで、MVを利用するための方法論を築く。

## 3. 研究の方法

### (1) MV生産菌の探索

MVは細胞培養液の上清から超遠心によって、単離し、密度勾配超遠心法によって精製した。膜特異的な蛍光色素で定量を行った。

### (2) MV形成機構および機能の解析

MVの中身を解析することで、その生産経路や機能の推定を行なった。推定された生産機構や機能を検証するために、遺伝子欠損株の作成など分子生物学的な方法を用いて解析した。

### (3) MV受容機構の解明

MVを蛍光ラベルすることでその動態をトラッキングできるようにし、MVが付着する細胞を種、株、細胞レベルで解析した。

### (4) MVデザイン方法の確立

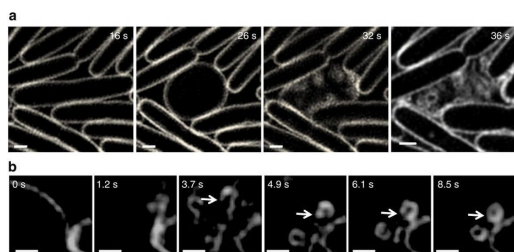
膜組成を改変することでMVの特性がどのように変化するのかについて解析した。

## 4. 研究成果

研究室保有株や活性汚泥から単離した株についてMV形成を調べたところ、グラム陰性細菌のみならず、膜の外側を厚い細胞壁で覆われた、グラム陽性細菌においても高MV形成が同定された。また、活性汚泥からはパラコッカス属細菌が多く単離された。単離されたパラコッカス属細菌に関してはその全てがMVを高生産することが明らかとなった。これらパラコッカス属細菌はシグナル物質も産生していた。環境サンプルから直接MVを回収する方法も検討し、MVが活性汚泥中に存在することも明らかとなった。

MV形成について、主にグラム陰性細菌の*Pseudomonas aeruginosa*をモデル細菌として解析した。その結果、これまでの予想を覆すMV形成機構を解明した。*P. aeruginosa*において、従来の仮説では、MVは細胞膜が外側にたわんで形成されると考えられていた。一方で、本研究では、細胞がMVを形成する様子を世界で初めて動画撮影することに成功し、細胞が破裂してMVが形成される機構を明らかにした。この現象はexplosive cell lysis (ECL)と名付け、ECLの詳細な機構も解明した。ECLの際にはDNAのような、細胞質内の内容物もMVと一緒に放出される。細胞外DNA

はバイオフィーム形成を支える役割があることが明らかとなっていたが、本研究によって ECL がバイオフィーム形成初期段階における細胞外 DNA の重要な供給源にもなっていることを突きとめた。ECL は細胞全体のなかの一部の細胞で誘発されるため、放出された MV や DNA は他の細胞が利用する。本成果は、Nature Communications に掲載され、国内外に大きなインパクトを与えた（図 1）。



**図 1.** *P. aeruginosa* が破裂して MV を形成する様子 (Turnbull L, Toyofuku M et al., *Nature Communications*, doi:10.1038/ncomms11220 より引用)。

前述したように、活性汚泥中から MV 生産菌及びシグナル物質産生菌として、パラコッカス属細菌が多数同定された。これらのパラコッカス属細菌においては、MV にシグナル物質が含まれていることが明らかとなった。MV を介した細菌間コミュニケーションを理解するために、パラコッカス属細菌のモデル細菌で環境浄化菌の一種である、*Paracoccus denitrificans* を用いて詳細な解析を行った。その結果、MV 一粒子あたりには、それを受け取った細菌の挙動を制御するのに十分なシグナル量が濃縮されており、シグナル伝達が行われることが明らかとなった。この知見から、実際の環境中での細菌間コミュニケーションを説明する新たなモデルとして、細菌における情報のデジタル化を提唱した。このモデルは疎水性の高いシグナル物質がどのように伝わるのかを説明するのに、有効なモデルであると考えている。さらに、MV の受容について解析したところ、*P. denitrificans* が生産した MV は主に同種の細菌に伝達されることが明らかとなった。どのようなメカニズムによって MV が細胞特異的に受け渡されるのかについては、引き続き解析中であり、他のモデル細菌を使った解析からも、膜組成が MV の付着性に大きな影響を与えることが分かっている。

これらの成果に加えて、*B. cenocepacia*, *Bacillus subtilis*, *Paracoccus denitrificans*, *Clostridium perfringens* に関してはゲノム支援より研究支援を得て、MV に含まれる DNA 配列を解析した。その結果、MV によって伝播される遺伝子群とそれらの DNA がどのようにして MV に含まれるのか

について示唆が得られた。

以上のように、本研究期間内で、MV 形成機構とその役割、また伝達性について、大きな成果が得られている。その結果、自然環境中での細菌間コミュニケーションを説明する新たなモデルも立てられた。また、膜組成が MV の付着性に大きな影響を与える知見は、MV とその内容物の受け渡しを理解するために重要である。本研究をさらに発展させ、MV を中心とした生物学の理解とその応用を今後進める。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

全て査読有

1. Toyofuku M, Morinaga K, Hashimoto Y, Uhl J, Shimamura H, Inaba H, Schmitt-Kopplin P, Eberl L, Nomura N. Membrane vesicle-mediated bacterial communication. *ISME J.* 2017 Mar 10. doi: 10.1038/ismej.2017.13.
2. Yoshida K, Toyofuku M, Obana N, Nomura N. Biofilm formation by *Paracoccus denitrificans* requires a type I secretion system dependent adhesin BapA. *FEMS Microbiol Lett.* 2017 Feb 2. 364 (4) doi: 10.1093/femsle/fnx029.
3. Yang J, Toyofuku M, Sakai R, Nomura N. Influence of the alginate production on cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environ Microbiol Rep.* 2017 Jan 25. doi: 10.1111/1758-2229.12521.
4. Turnbull L, Toyofuku M, Hynen AL, Kurosawa M, Pessi G, Petty NK, Osvath SR, Cárcamo-Oyarce G, Gloag ES, Shimoni R, Omasits U, Ito S, Yap X, Monahan LG, Cavaliere R, Ahrens CH, Charles IG, Nomura N, Eberl L and Whitchurch CB. Explosive cell lysis is a novel mechanism for the biogenesis of membrane vesicles and biofilms. *Nature Communications*, 7, Article number: 11220, 2016. doi:10.1038/ncomms11220.

5. 豊福雅典, 森永花菜, 野村暢彦「メゾコピック微生物学の夜明け」**環境バイオテクノロジー学会誌**, 2016 Aug 27,16(1): 23-29
6. 尾花望, 黒沢正治, 豊福雅典, 野村暢彦「微生物が能動的に産生するメンブランベシクルの生合成と機能」**化学と生物**, 2016, 54:812-819
7. 豊福雅典, 尾花望, 野村暢彦「微生物間相互作用を利用した複合系バイオフィルムの制御」**バイオインダストリー**, 2016, 33: 29-34.
8. Inaba T, Oura H, Morinaga K, Toyofuku M, Nomura N. The *Pseudomonas* Quinolone Signal Inhibits Biofilm Development of *Streptococcus mutans*. **Microbes Environ.** 2015 Apr 9. 30(2):189-91. doi: 10.1264/jsme2.ME14140.
9. Toyofuku M, Tashiro Y, Hasegawa Y, Kurosawa M, Nomura N. Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. **Adv. Colloid Interface Sci.** 226 (Pt A):65-77 (2015).
10. Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N. Environmental factors that shape biofilm formation. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 80:7-12 (2015).
11. 豊福雅典, 黒沢正治, 野村暢彦「バクテリアが生産する膜小胞,メンブランベシクル」**環境バイオテクノロジー学会誌**, 14, 107-111, 2015-03
12. 稲葉知大, 清川達則, 尾花望, 豊福雅典, 八幡穰, 野村暢彦「集団微生物学のすすめ～バイオフィルムとその解析技術」**化学と生物**, 52: 594-601 (2014, 09).
13. Masakase Hamada, Masanori Toyofuku, Tomoki Miyano, Nobuhiko Nomura. cbb3-type cytochrome c oxidases, aerobic respiratory enzymes, impact the anaerobic life of

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, 196: 3881-3889 (2014). doi: 10.1128/JB.01978-14.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 豊福雅典, 諸星知広, 池田宰, 野村暢彦「複合微生物系における細胞間シグナル伝達とその応用」日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌コンベンションセンター, 北海道, 札幌, 2016 年 3 月 27 日-3 月 30 日.
2. 豊福雅典 “Membrane vesicle release through explosive cell lysis” 第 50 回緑膿菌感染症研究会, ヒルトン東京お台場, 東京都港区, 2016 年 2 月 4 日-2 月 6 日.
3. Toyofuku M “Intercellular membrane trafficking in bacteria” The International Symposium on Microbial Response, Adaptation, and Evolution in the Environment, The University of Tokyo, Tokyo, Bunkyo-ku, 25 October, 2015.
4. 豊福雅典, Leo Eberl, 野村暢彦「細菌が能動的に生産する膜小胞,メンブランベシクル」日本農芸化学会2015年度大会, 岡山大学, 岡山県岡山市, 2015年3月26日-3月29日.
5. Masanori Toyofuku, Yohei Hashimoto, Hideki Inaba, Nobuhiko Nomura. “Membrane vesicle trafficking of a long-chain acyl-homoserine lactone, C16-HSL” 5<sup>th</sup> ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria, Texas, USA, 18-21 October, 2014.
6. 豊福雅典, Leo Eberl, 野村暢彦「メンブランベシクルから見えてくる新たな微生物間コミュニケーション、バイオフィルム像」第66回日本生物工学会大会, 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市, 2014年9月9日-11日.
7. 豊福雅典「細菌間メンブランチラフィック」第8回細菌学若手コロッセウム, ホテルニセコいこいの村, 北海道虻田郡ニセコ町, 2014 年8月6日-8日

〔図書〕(計 3 件)

1. Masanori Toyofuku, Youske Tashiro, Inaba Tomohiro, Nobuhiko Nomura. “Bacterial interactions” In: **Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Sciences**. Wiley. 68-81 (October, 2016)
2. Masanori Toyofuku, George A. O’Toole, Nobuhiko Nomura. “Anaerobic life of *Pseudomonas aeruginosa*” p 99-117. In: ***Pseudomonas* Vol. 7** (Springer, 2015)
3. 豊福雅典、野村暢彦（分担）『微生物のコミュニケーション』**環境と微生物の辞典**、日本微生物生態学会編. 朝倉書店 (2014.07.10) pp 62-63.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.envr.tsukuba.ac.jp/~microbi/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

豊福 雅典 (TOYOFUKU, Masanori)

筑波大学 生命環境系 助教

研究者番号：30644827