

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14795

研究課題名(和文)細菌から探る、コミュニケーションの地理的な系統と推移

研究課題名(英文)Phenotypic variation in bacterial communication

研究代表者

豊福 雅典 (TOYOFUKU, Masanori)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：30644827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：環境に応じてどのように生物のコミュニケーションが変遷していくのかについて、遺伝子レベルまで行う研究はほとんどなかった。本研究では、淡水域、沿岸域、外洋域という異なる水圏環境から単離された緑膿菌の単離株を用いて、微生物間コミュニケーションシステムを比較することにした。その結果、環境ごとに微生物間コミュニケーション能力が異なることが明らかとなった。また、挿入配列によって微生物間コミュニケーションの相変異がおきることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物間コミュニケーション研究のほとんどが病原性に関連したものであり、生態学的な研究は少ない。特に、系統地理学的な研究は皆無である。また、従来のコミュニケーション研究はいわゆる高等な生物を対象に行われるものがほとんどであり、遺伝子レベルでの系統学的解析は困難であった。単純な細菌のコミュニケーションだからこそ、コミュニケーションと環境・生態の関係に遺伝子レベルで迫ることができた。

研究成果の概要(英文)：Communication among individuals is vital in most of the living systems including bacteria. In order to gain insight into the elusion of bacterial communication we analyzed several environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and compared their quorum sensing systems. We found that the quorum sensing system varies among the isolates and ones isolated from poor nutrient environments often had mutations in the quorum sensing systems. Interestingly some of the strains carried insertion sequences in the quorum sensing genes, which could jump in and out from the gene. This allowed the strain to switch on and off the quorum sensing system depending on the environment. In summary we found a unique phase variation system in bacterial communication where it is regulated by insertion sequence.

研究分野：微生物学

キーワード：微生物間コミュニケーション 相変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトを含め、生物はコミュニケーション手段を発達させてきた。こうしたコミュニケーションが同一種内においてどのように地域で異なるのか、またその変化を促すものは何であるかは生物の進化や生態を知る上で重要である。本研究では、生物におけるコミュニケーションの地理的な系統とその推移を理解するために、分子生物学的なアプローチが取れる細菌のコミュニケーションに着目した。

(2) 細菌はシグナル物質を介して同種内でコミュニケーションを行うことがわかっている。クオラムセンシング(QS)はそのような微生物間コミュニケーションの一つであり、シグナル物質を介して集団内の細胞密度を感知し、様々な遺伝子の発現を調節する。その結果、同種内で遺伝子発現が同調され、集団行動が統制される。種によって用いるシグナル物質とそれを認識する受容体が異なるため、微生物間コミュニケーションは多くの場合が種特異的である。*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)は日和見感染菌としてもしばしば問題になる細菌で環境中に広く存在し、QSのモデル細菌として世界中で研究されている。

(3) 緑膿菌は少なくとも *las*、*rhl*、*pqs* の三つの QS システムを有していることが現在までに明らかとなっている。それぞれのシステムは、シグナル生合成遺伝子 *lasI*、*rhlI*、*pqsA* によって産生される 3-oxo-C₁₂-HSL、C₄-HSL、PQS シグナルと、それらのレセプターである LasR、RhlR、PqsR によって構成されており、病原性因子など多くの遺伝子の転写を調節している。

2. 研究の目的

(1) 環境に応じてどのように生物のコミュニケーションが変遷していくのかについて、遺伝子レベルまで行う研究はほとんどなかった。我々は、緑膿菌が環境に応じてコミュニケーション能力を変化させていることを見出し(Fang et al, 2013 *BBB*)、これをきっかけに棲息環境に応じて、異なるコミュニケーションシステムを保持しているのではないかと考えるに至った。そこで、本研究では、淡水域、沿岸域、外洋域という異なる水圏環境から単離された緑膿菌の単離株を用いて、微生物間コミュニケーションシステムを比較することにした。

3. 研究の方法

(1) 環境単離株

緑膿菌の環境単離株は東京大学 大気海洋研究所の木暮一啓教授より分譲してもらった。

(2) シグナル物質産生と応答性の解析

環境単離株のシグナル物質産生は、QS 制御下のプロモーターと蛍光タンパク質を融合させた、*las*、*rhl*、*pqs* それぞれのレポーター株を用いて解析した。コントロールとして、PA01 株を用いた。シグナルへの応答性は、シグナル物質を添加することで検証した。

(3) QS に関わる遺伝子の解析

Las、*rhl* および *pqs* システムのシグナル合成遺伝子とレセプターについて、環境単離株それぞれの遺伝子配列を解析した。

(4) 試験管での進化実験

貧栄養培地あるいは富栄養培地において、株を 24 時間ごとに継代培養し、QS システムの変化について、プロテアーゼ活性を指標に一次スクリーニングし、PCR と遺伝子解析によって確認した。

4. 研究の成果

(1) 異なる水圏環境から単離された緑膿菌について、20 株以上の QS システムを解析したところ、これらの環境分離株の中には PAO1 株と比べてシグナル生産量や応答性が異なっている株が複数存在し、特に外洋域からは QS システムの機能が一部欠失した株が多く分離された。QS は細胞密度依存的なシステムであるため、細胞密度が低い外洋域では、QS を欠失しやすいと考えられる。

(2) QS の欠失はシグナル合成遺伝子が受容体タンパク質をコードする遺伝子への変異の 2 通りが大まかに考えられる。QS 関連遺伝子のシーケンス解析の結果、QS システムの機能が一部欠損した株において、異なる変異が入っていることが明らかとなった。興味深いことに、挿入配列 (Insertion sequence, IS) が挿入されることで QS 関連遺伝子が破壊されている株がいくつか見つかった。また、いくつかの株からは、QS システムが異なる形状の違うコロニーが観察された (図 1)。

(3) IS は可動性遺伝因子の一つであり、自身の配列中にコードされるトランスポザナーゼの働きによって、ゲノム上を転移できる性質を持つ。従って、IS が挿入されている遺伝子はそれが転出することで、機能を復帰する可能性がある。そこで、本研究では IS を保持している株の一つに着目し、IS の転移による QS の切り替えについて解析した。異なる培地条件を用いて、継代培養した結果、IS が QS 遺伝子から転出し、QS が回復した株が観察された。

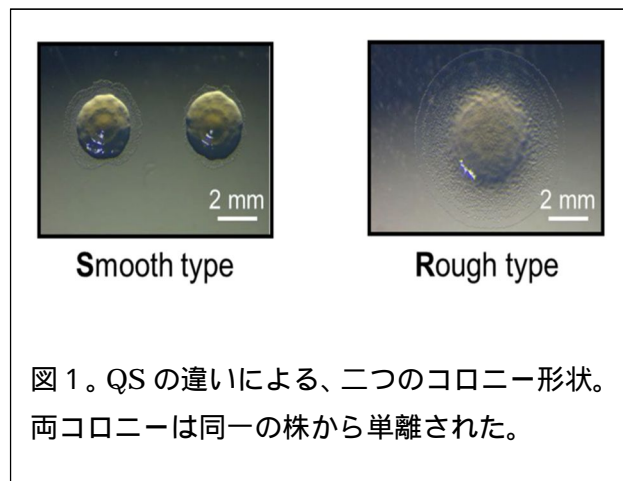


図 1. QS の違いによる、二つのコロニー形状。両コロニーは同一の株から単離された。

さらには IS が QS 遺伝子に挿入されて QS の機能を失うことも明らかとなり、本 IS によって QS 遺伝子が相変異を起こしている可能性が明らかとなった。

(4) 遺伝子配列解析の結果、当該 IS は、緑膿菌以外の種でも同定されていることが明らかとなった。IS は一般的に水平伝播すると考えられているが、どのような機構で水平伝播するかについてはその多くは明らかになっていない。当研究では、遺伝子の水平伝播の新たな様式として近年注目を浴びることになった、メンブレンベシクルについて解析した。PCR によって解析した結果、メンブレンベシクルに挿入配列が含まれる可能性が示された。今後は、メンブレンベシクルを介して本挿入配列が細胞間で伝播するかを解析していく予定である。

(5) 本研究では、緑膿菌の環境単離株を用いて微生物間コミュニケーションの系統地理学的解析を行ったところ、外洋域では QS システムを失う傾向にあることが示された。さらに、詳細な解析により、これらの株の多くは QS システムを完全に失っておらず、相変異によって、QS を切り替えている様子が明らかとなった。本成果は環境に応じて遺伝子レベルでコミュニケーション能力がどのように変化するのかについて基礎的な知見を与える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Toyofuku M, Yoon SS	4. 巻 72
2. 論文標題 Nitric oxide, an old molecule with noble functions in Pseudomonas aeruginosa biology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in Microbial Physiology	6. 最初と最後の頁 117-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2018.01.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyofuku M, Nomura N, Eberl L	4. 巻 17
2. 論文標題 Types and origins of bacterial membrane vesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Reviews Microbiology	6. 最初と最後の頁 13-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 豊福雅典	4. 巻 56
2. 論文標題 細菌が放出する膜小胞の新たな展開	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 79-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masanori Toyofuku, Nobuhiko Nomura	4. 巻 32
2. 論文標題 What will membrane vesicles (MVs) bring to bacterial communication?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 185-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME3203rh	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiyokawa T, Usuba R, Obana N, Yokokawa M, Toyofuku M, Suzuki H, Nomura N	4. 巻 32
2. 論文標題 A Versatile and Rapidly Deployable Device to Enable Spatiotemporal Observations of the Sessile Microbes and Environmental Surfaces	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbes Environ.	6. 最初と最後の頁 81-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME16161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toyofuku M, Morinaga K, Hashimoto Y, Uhl J, Shimamura H, Inaba H, Schmitt-Kopplin P, Eberl L, Nomura N	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Membrane vesicle-mediated bacterial communication	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ISME j.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ismej.2017.13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yang J, Toyofuku M, Sakai R, Nomura N	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Influence of the alginate production on cell-to-cell communication in Pseudomonas aeruginosa PAO1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Environ Microbiol Rep.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1758-2229.12521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 豊福雅典, 森永花菜, 野村暢彦	4. 巻 16
2. 論文標題 メソスコピック微生物学の夜明け	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 環境バイオテクノロジー学会誌	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 豊福雅典, 野村暢彦	4. 巻 74
2. 論文標題 細胞破裂を介した細菌のバイオフィルムとベシクル形成	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 420-421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 メンブレンベシクルからみえてきた細菌の多様な情報戦略
3. 学会等名 日本微生物生態学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 Challenging the dogma of bacterial membrane vesicle formation
3. 学会等名 10th Asian Symposium on Microbial Ecology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 低分子化合物及び膜小胞を介した細菌間相互作用に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018年度第3回関東支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 膜小胞を介した細菌間の情報伝達
3. 学会等名 化学コミュニケーションのフロンティア第2回若手シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊福雅典, 森永花菜, Leo Eberl, 野村暢彦
2. 発表標題 細菌によるデジタルな情報伝達!?
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masanori Toyofuku, Nobuhiko Nomura, Leo Eberl
2. 発表標題 Membrane vesicle formation through cell death
3. 学会等名 FEMS Microbiology Congress 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 メンブレンベシクルを介した細菌間コミュニケーション
3. 学会等名 日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 低分子化合物及び膜小胞を介した細菌間相互作用に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 豊福雅典, 野村暢彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版株式会社	5. 総ページ数 2
3. 書名 現代コロイド界面化学の基礎	

1. 著者名 豊福雅典 他199名	4. 発行年 2017年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 512
3. 書名 食と微生物の辞典	

1. 著者名 Masanori Toyofuku, Youske Tashiro, Inaba Tomohiro, Nobuhiko Nomura	4. 発行年 2016年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 68-81
3. 書名 “Bacterial interactions” In: Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Sciences	

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学 MiCS
<https://www.mics.tsukuba.ac.jp>
研究室HP
<http://www.envr.tsukuba.ac.jp/~microbio/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----