



## 細菌が生産する小胞の機能と形成機構に関する研究

静岡大学大学院工学領域化学バイオ工学系列 田代陽介

### はじめに

細菌は細胞内外にナノサイズの微粒子である小胞を形成する。細菌の細胞外小胞として知られているのが、直径20–400 nmの膜小胞である。膜小胞は内部に微生物由来のDNAやタンパク質等の生体高分子を含有する他、表層に微生物特有の多糖を保持している。また、動物・植物・微生物など様々な細胞に内包物質を送達する機能を有しており、宿主の免疫活性化にも働いている。そのため、膜小胞はワクチンの抗原やドラッグデリバリーシステム(DDS)、DNA導入媒体など、特定の物質を細胞に送達する媒体としての応用が期待されている。一方、細胞内に存在する小胞としてガス小胞が知られており、ワクチン媒体や超音波画像法の造影剤としての応用が着目されている。しかし、このような小胞の生物学的機能や形成機構に関して未解明な部分が多く、上記応用のためにはそれらの理解が必要不可欠である。こうした背景から、細菌由来の小胞の生物学的応用を最終目的とし、小胞の形成機構解明を目指して研究を遂行してきた。

### 1. 緑膿菌における膜小胞の特性と形成機構

#### 1-1. 緑膿菌が形成する膜小胞の特性解析

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は環境中に多く存在する日和見感染菌であり、膜小胞を介して細菌間コミュニケーションや宿主細胞への毒素運搬を行っている。筆者らは緑膿菌をモデル微生物として、どのような組成の膜小胞がいつ形成されるのかを調べるために、各培養段階における膜小胞特性を解析した。その結果、各培養段階で異なるタンパク質構成の膜小胞が形成されていること、膜小胞には飽和脂肪酸が多く含有されることが明らかとなった<sup>1-3)</sup>。

#### 1-2. 膜間隙でのタンパク質蓄積による膜小胞形成亢進

緑膿菌における膜小胞形成機構を解明するために、表層を構成する因子の欠損株を作製して膜小胞形成への影響を解析した。外膜タンパク質Opr86は大腸菌BamAと相同性があり、外膜タンパク質のアセンブリに関与する。Opr86の発現低下株を作製したところ、膜小胞を過剰に放出することが見出された<sup>4)</sup>。さらに、ペリプラズムに存在するプロテアーゼMucDを欠損すると膜小胞形成が促進された<sup>5)</sup>。以上により、ペリプ

ラズムにアセンブリ不全のタンパク質が蓄積すると膜小胞形成が誘発される機構が示された(図1)。

#### 1-3. 膜小胞形成を制御する化合物

細菌の膜小胞形成を制御するためには、その形成に影響を与える化合物の探索が必須である。緑膿菌が細胞外シグナル物質として利用している2-heptyl-3-hydroxyl-4-quinolone (*Pseudomonas* quinolone signal: PQS)は膜小胞に高濃度に存在することが既に知られていたが、このPQSは緑膿菌だけではなく、大腸菌や枯草菌など、グラム陰性・陽性問わず様々な細菌の膜小胞形成を誘発することが明らかとなった<sup>6)</sup>。この結果から、PQSはあらゆる微生物の膜小胞形成向上に適用可能な化合物であることが示された。一方、膜小胞を低下させる化合物を探索した結果、インドールなどの二環式化合物が緑膿菌のPQS合成を阻害し、膜小胞形成を抑制することが明らかとなった<sup>7)</sup>。

### 2. 膜小胞-微生物間相互作用の機構解明と選択的物質送達

膜小胞は微生物間情報伝達における物質運搬としての機能を有しているが、どの微生物が膜小胞を受け取るのかに関して十分な理解がなされていなかった。膜小胞形成量の多い細菌数十種における各細菌間相互作用を解析したところ、膜小胞が特定の細菌に選択的に物質を送達する現象が見出され、表面電位と粒子径が両粒子間の相互作用に重要であることが明らかになった。さらに、膜小胞に抗生物質を保持させることにより、特定の細菌を選択的に殺菌可能であることが示された。これらの結果により、微生物間相互作用の一端が明らかとなったのに加え、多種多様な微生物種を膜小胞により制御するDDSへの応用の可能性が示された<sup>8)</sup>。

### 3. 膜小胞の多様性解析と新規形状膜小胞の放出機構解明

従来まで細菌から放出される膜小胞の多様性は明らかになっていなかった。多くのグラム陰性細菌でペリプラズムに局在するTolBの欠損株を用いて膜小胞の応用研究が数多くされている。我々は *Buttiauxella agrestis* JCM 1090<sup>T</sup> 株が膜小胞過剰形成細菌であることを見出し、当菌株の *tolB* 遺伝子欠損株における膜小胞の形状を解析した。その結果、粒子径の小さい小型膜小胞や、今までに報告例のない多重膜小胞ならびに多胞膜小胞を放出することが明らかとなった。そのようなユニークな膜小胞の形成機構を解明するために、急速凍結切断レプリカ電子顕微鏡法により細胞を観察したところ、細胞内部に小胞あるいは二重膜小胞が蓄積していることが明らかとなり、従来とは全く異なる膜小胞形成プロセスが示された(図2)<sup>9)</sup>。

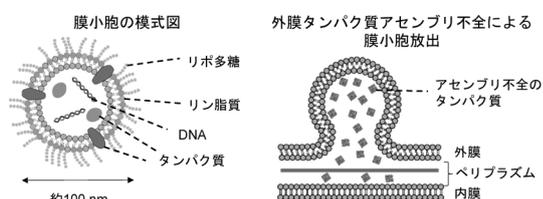


図1. 細菌が細胞外に放出する膜小胞

