

筑波大学生命環境系 豊 福 雅 典

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

はじめに

細菌は互いに我関せずには生きていたと思われていたが、集団を形成し、機能的に分化するなどして、高度な社会性、集団性を示すことが明らかになってきた。こういった細菌の社会性の創発には、細胞間相互作用が関与する。自然界において細菌は集団を形成し、さらには複数種の細菌が混在する複合系で存在することから、細菌社会の仕組みを理解することは、細菌の生態を真に理解する上でも重要である。こうした理由から、私は細菌の個と集団の関係性に興味を持ち、細菌間相互作用の解明に取り組んできた。その過程で、細菌間コミュニケーションやメンブレンベシクル形成の新しい像がみえてきた。

1. 低分子化合物による細菌間相互作用

1-1. 細菌間コミュニケーションによる一次代謝の調節

多くの細菌は低分子化合物を細胞間シグナル物質として用いてコミュニケーションをとっている。従来、細菌間コミュニケーションは二次代謝の制御に関わると考えられていた。しかしながら、我々は *Pseudomonas aeruginosa* を解析した結果、一次代謝の脱窒が細菌間コミュニケーションによって調節されていることを明らかにした。*P. aeruginosa* はグラム陰性細菌で最も多く利用されているアシル化ホモセリンラクトン (AHL) 類と *P. aeruginosa* 独自の *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) をシグナル物質として用いている。それぞれのシグナル物質は特異的な受容体によって認識されて、シグナル物質濃度に応じて、病原性因子を含む数百種類もの遺伝子の発現が制御される。我々は AHL と PQS は共に脱窒を抑制しており、細菌が集団に応じてエネルギー代謝を調節していることを明らかにした。一般的に、細菌のエネルギー代謝は物理化学的な要因によって調節されることから、物質生産、排水処理等の応用現場においては環境を最適化させる工学的な制御アプローチが取られてきた。我々の成果は、従来法とは異なる、細菌の力を引き出す新たな方法論を生み出す糸口になると考えられる。

1-2. 環境が細菌間コミュニケーションに与える影響

P. aeruginosa が脱窒を調節することが明らかとなったものの、*P. aeruginosa* の細菌間コミュニケーションやバイオフィーム形成が環境に応じてどのように変化するかについて理解が進んでいなかった。*P. aeruginosa* は脱窒を行うような嫌気場でも病原性を発揮して細菌間コミュニケーションを活発に行なっていることが示唆されている一方で、嫌気条件下でシグナル物質産生が低下することが研究標準株で報告されるなど、一見して相反する報告が続いていた。

この相反する報告は、株間の性質の違いによるものと我々は考え、複数の *P. aeruginosa* 単離株の表現型を比較した。その結果、嫌気条件下では AHL 産生能やバイオフィーム形成量が株間で大きく異なることを明らかにした。脱窒の中間産物である一酸化窒素の蓄積量の違いによって嫌気条件下での多様性が

生じると思われる。バイオフィームなど、好気と嫌気な微小環境が形成されるような場は自然界で多く見られるのに対し、従来の細菌間コミュニケーション研究は好気条件下でそのほとんどが行われていた。我々は環境に応じて *P. aeruginosa* がどのように細胞間相互作用を適応させているのかを理解することで、細胞間相互作用と環境応答を総合的に解明していく重要性を示した。

2. MV による細菌間コミュニケーションの交通整理

シグナル物質の細菌間での伝達は、細菌間コミュニケーションが成立するための鍵となるステップである。疎水性の高いシグナル物質 (長鎖 AHL) がどのようにして細胞間で伝達するかについて未解明な部分が多かった。我々は、*Paracoccus denitrificans* において長鎖 AHL がメンブレンベシクル (MV) を介して伝達されることを見出した。

MV は細胞膜から構成される球状の小胞で、シグナル物質や核酸、毒素因子を含み、放出された MV は他の細胞に伝達される。また、MV はワクチンとして利用され、ドラッグデリバリー等のナノテクノロジーの技術基盤としても注目を浴びるなど、応用面においても高い潜在能力を持つ。

定量の結果、*P. denitrificans* の MV 1 粒子には遺伝子発現を制御するのに十分なシグナル量が含まれることが明らかとなった。このことにより、MV を受容する細菌と、しない細菌で「とびとび」にシグナルが伝達されることが想定される。これは、連続的にシグナル物質が拡散すると仮定した、集団を同調させる古典的な細菌間コミュニケーション (クオラムセンシング) とは一線を画すため、我々は細菌における「バイナリーシグナリング」を提唱した。MV を介したバイナリーシグナリングはシグナル物質が希釈されやすいような実環境中や長距離でのシグナル伝達において威力を発揮すると思われる (図1)。*P. denitrificans* の MV は同種に運搬されやすいことも解明し、MV によるシグナル伝達の交通整理を明らかにした。

3. MV 形成機構の解明

3-1. 生育環境が MV に与える影響

MV の機能を理解する上で、MV の中身を知ることは必須で

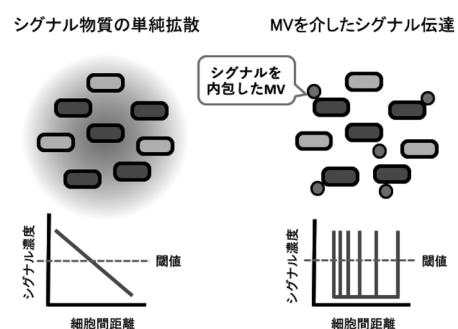


図1. MV を介したシグナル伝達

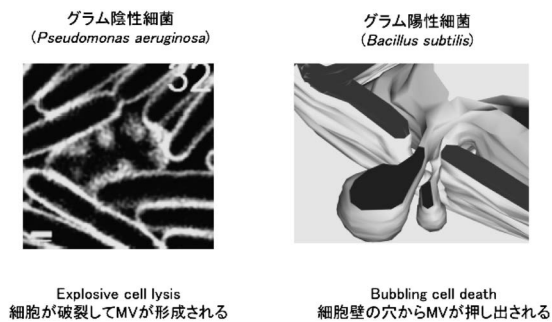


図2. エンドリシンによるMV形成機構

ある。我々は *P. aeruginosa* においてバイオフィームと浮遊細胞由来のMVに含まれるタンパク質を比較し、その中身が大きく異なることを明らかにした。これは、生育環境に応じてその中身が変化し、MV機能そのものが変化することを示唆する。さらに、バイオフィームを覆っている細胞外マトリクスのプロテオーム解析を行い、細胞外マトリクスに含まれるタンパク質の多くがMV由来であることを突き止めた。細胞外マトリクスは多糖やDNA、タンパク質から構成されてバイオフィームの構造を支えている。本成果はMVが細胞外マトリクスの主要な成分の一つであることを明らかにし、環境に応じて細胞外マトリクスに様々な機能を付与する可能性を示した。

3-2. 細胞死を伴うMV形成メカニズムの発見

環境に応じてMVの中身が変わることは、MVにはいくつかの誘導機序が存在していることを示唆している。バイオフィーム内部は嫌気になることから、嫌気条件下におけるMV形成に着目したところ、嫌気条件下では好気に比べて多くのMVが放出されることを見出した。そのメカニズムとして、嫌気条件下で細胞が受けるストレスによってSOS応答が誘導され、その制御下の遺伝子群がMV形成に関与することを明らかにした。

どの遺伝子がMV形成に関わるかを同定するために、MV形成に関わるmRNAはMVに濃縮されると仮定し、MVに含まれるmRNAを網羅的に解読した。その結果、SOS応答制御下の細胞溶菌システム(ホリン-エンドリシン)のmRNAがMVに濃縮されており、その翻訳産物がMV形成に関わることを突き止めた。エンドリシンは細胞壁分解活性を有し、ホリンはエンドリシンを細胞壁に輸送する役割を果たしている。MVが形成される過程を *P. aeruginosa* で超解像顕微鏡によりライブセルイメージングしたところ、細胞が破裂して、そこから生じた膜断片が会合することでMVが形成されることを明らかにした。従来の考えでは、グラム陰性細菌のMVは細胞外膜が撓んでつまみ出される形で形成される、とされていたが、細胞破裂を介した全く異なるMV形成メカニズムを提唱するに至った。Explosive cell lysis (ECL)と名付けた当該機構は、MVは

細菌が生きたまま放出するという、従来のMV形成の仮説と根本的に異なる(図2)。エンドリシンは通常、集団全体の数%の細胞でのみ誘導されるため、一部の細胞が溶菌しても、残った細胞がその恩恵に預かる。エンドリシンは細菌間で広く保存されているため、普遍性の高いMV形成因子である可能性が高い。

3-3. グラム陽性細菌のMV形成機構の解明

MV形成を理解する上で、膜を厚い細胞壁で覆われたグラム陽性細菌がどのようにしてMVを形成して細胞外に放出するかが未解明のままであった。我々は、グラム陰性細菌でMV形成に関わっていたエンドリシンが、グラム陽性細菌のモデル細菌である、*Bacillus subtilis*のMV形成にも直接的に関与していることを見出し、グラム陽性細菌のMV形成機構を世界で初めて解明した。グラム陰性細菌とは異なり、*B. subtilis*においてECLは誘導されず、エンドリシンの作用によって細胞壁に穴が生じ、そこからMVが形成・放出されること(bubbling cell death; BCD)を発見した(図2)。ECLと同様に、MVを放出した細胞は死ぬことを明らかにし、細菌において細胞死を介したMV形成機構は共通して備わっている一般的な機構でと示した。

おわりに

本研究では、細胞間コミュニケーションやMVを中心として、細菌における相互作用を解明してきた。そこから、いかに細菌が高度な情報戦略をとって、集団を統制しているかが垣間見える。単細胞生物だからこそみえてくる多様な細胞間相互作用を今後も解き明かしていきたい。

謝辞 本研究は、筑波大学生命環境系と、チューリッヒ大学 植物・微生物学科にて行われたものです。学生の頃から今日に至るまで、本研究に携わる機会を与えて頂き、終始ご指導ご鞭撻を賜りました。筑波大学教授・野村暢彦先生には心から感謝申し上げます。また、チューリッヒ大学教授・Leo Eberl先生には本研究を発展させるにあたり、公私にわたり親身にご支援いただきましたこと深く感謝致します。日頃より温かいお言葉とご助言を頂きました筑波大学名誉教授・内山裕夫先生、同大学教授・中島敏明先生に厚く御礼申し上げます。様々な面からご支援頂いた静岡大学助教・田代陽介先生、筑波大学助教・八幡穰先生、同大学助教・尾花望先生に感謝申し上げます。本研究の成果は、多くの共同研究者の先生方、研究室の諸先輩方、博士研究員、在学生、卒業生、また研究の運営に携わる皆様のご尽力、ご支援によるものです。山本達也博士、古川理恵氏をはじめ、ここに全ての方のお名前を挙げる事ができませんが、皆様に深く感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦いただきました筑波大学教授・小林達彦先生に厚く御礼申し上げます。