

ガス小胞が付与する微生物の垂直運動マシナリー

田代 陽介

はじめに

多くの原核生物は環境に適応するために、べん毛を用いた遊泳運動¹⁻⁴⁾や線毛などを利用した滑走運動⁵⁻⁷⁾のようなエネルギーを直接消費して移動する運動能を発達させてきた。一方、一部の微生物はエネルギーを直接利用せずに移動する機能を身につけており、その代表例としてガス小胞 (gas vesicles) を利用した垂直運動が挙げられる。ガス小胞とは、いくつかのバクテリアあるいはアーキアが細胞内に形成するガス封入型構造体であり、前稿で紹介したマグネトソーム⁸⁾と同様に原核細胞のオルガネラとして知られている。1-数 μm サイズの原核細胞の中に、幅45-250 nm、長さ100-800 nm程度のガス小胞が存在している(図1)⁹⁾。ガス小胞の外殻はリン脂質ではなく疎水性のタンパク質で構成されており、厚さは約2 nmと薄い膜となっている。この膜はガス透過性であり、細胞質内に溶解している気体が透過され小胞内に蓄積される。この膜を透過できる気体として、 H_2 、 N_2 、 O_2 、 CO_2 、 CO 、 CH_4 ならびにArなどが知られている⁹⁾。これまでに、光合成を行うシアノバクテリアや、ロドプシンを合成するハロアーキアで、ガス小胞による浮力向上が確認されてきた⁹⁾。しかし近年、筆者らを含めた研究により、 γ -プロテオバクテリアである *Serratia* sp. ATCC 39006 株が形成するガス小胞は、上記の微生物が形成する小胞とは異なる特徴を有することが明らかになってきた¹⁰⁻¹²⁾。本稿では、ガス小胞の多様性と *Serratia* sp. における形成機構を述べるとともに、特徴的な構造をしたガス小胞の生物工学的利用について紹介する。

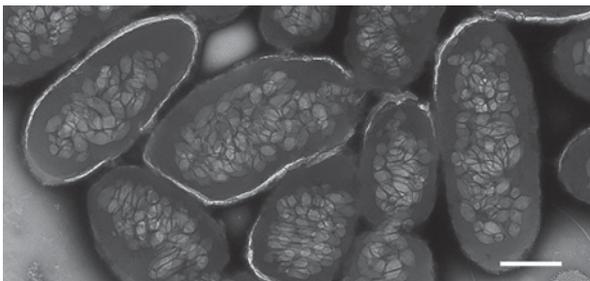


図1. *Serratia* sp. ATCC 39006 株の透過電子顕微鏡写真。細胞内に蓄積されているのがガス小胞。バーは500 nmを示す。

ガス小胞形成微生物

ガス小胞の存在はすでに19世紀にシアノバクテリアなどの細菌で見つかっており、100年以上にわたり光合成細菌と好塩性アーキアを中心にその研究が行われてきた⁹⁻¹³⁾。一方、従属栄養細菌では1970年代に *Ancylobacter aquaticus* でガス小胞形成が確認されていたものの¹⁴⁾、その遺伝子解析は行われていなかった。近年のゲノム解析により、さまざまな微生物でガス小胞形成をコードする遺伝子群が見ついている。その遺伝子群は図2の各門に属するバクテリアやアーキアに分布しており、それぞれの門では特有の遺伝子クラスター構造が存在している。従属栄養細菌では、土壌細菌である *Bacillus megaterium* でもガス小胞形成が確認されている¹⁵⁾。一方、ガス小胞形成遺伝子クラスターは *Streptomyces* 属や *Rhodococcus* 属細菌にも保存されているが、ガス小胞形成自体は未だ確認されておらず、こ

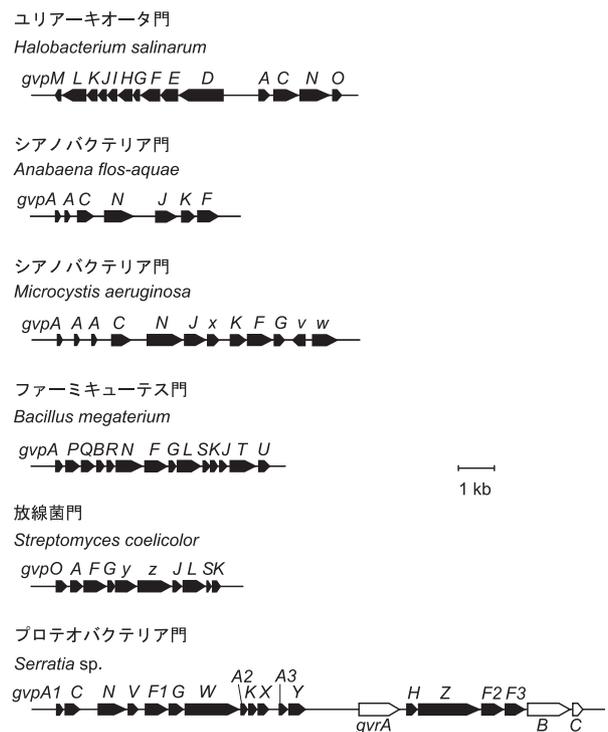


図2. 微生物におけるガス小胞形成遺伝子クラスターの代表例。gvp 遺伝子を黒で、gvr 遺伝子を白で示す。

著者紹介 静岡大学工学領域化学バイオ工学系列(講師) E-mail: tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp

の遺伝子群が放線菌に存在する意義は不明である¹⁶⁾。近年、ガス小胞形成が確認された *Serratia* sp. のクラスターは既知のガス小胞遺伝子クラスターに比べて長く、機能未知の遺伝子を多く含んでいる。プロテオバクテリア門に属する他の細菌でもそれらのオーソログが存在しており、類似のガス小胞形成機構を有している可能性が考えられる。

外部環境を認識したガス小胞形成制御

Serratia sp. は外部環境を認識してガス小胞形成を調節する機構を有している¹⁰⁾。特に低酸素条件下でガス小胞形成が促進されることから、ガス小胞形成は酸素濃度の高い気液界面に移行するための運動機能として機能していると考えられる。

また *Serratia* sp. は、アシル化ホモセリンラクトンの一種である *N*-butanoyl-L-homoserine lactone を介したクオラムセンシング機構を有しており、菌体が一定の密度に達した際に植物感染に必要な病原因子などを含めたさまざまな形質を発揮する。本菌においては、ガス小胞形成もクオラムセンシングにより正に制御されている¹⁰⁾。ストークスの式に基づくと、細菌が凝集した際に垂直運動の速度は上昇する⁹⁾。そのため、クオラムセンシングによるガス小胞形成促進は、効率的な垂直運動に寄与すると考えられる。

Serratia sp. は運動様式としてガス小胞以外にべん毛も有している。他のガス小胞形成微生物を見てみると、シアノバクテリアはべん毛を持っておらず、ハロアーキアはガス小胞を形成しながらべん毛運動も行っている。*Serratia* sp. は従来研究されてきたガス小胞形成微生物とは異なり、べん毛運動とガス小胞形成を使い分ける機能を有している。その二つの運動様式を切り替えているのが、small RNA 結合タンパク質 RsmA である¹⁰⁾。RsmA 欠損によりガス小胞形成が阻害されるものの、べん毛運動は促進される(図3)。大腸菌では、RsmA (CsrA)

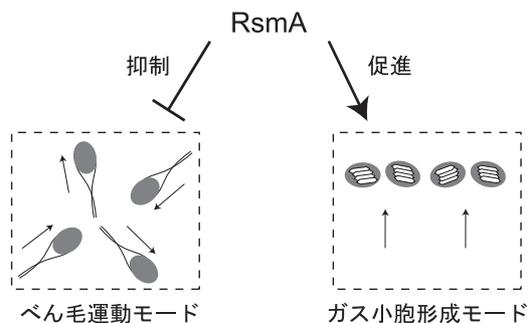


図3. *Serratia* sp. における2種の運動性の調節機構

は炭素飢餓に関与するさまざまな遺伝子の転写を制御することが知られている¹⁷⁾。べん毛運動は三次元の遊泳を可能にするものの、移動の際にはモーターの回転にエネルギーが絶えず必要であることから、本菌は周囲の栄養状態を認識して、ガス小胞形成を介した垂直運動とべん毛運動とを使い分けていると考えられる。

ガス小胞の形成機構

前述の通り、*Serratia* sp. は他の微生物より多くのガス小胞形成関連遺伝子を保有しており、その大半が機能未知の遺伝子である。筆者らは、各遺伝子の in-frame 欠損株を作製してガス小胞形成能を評価することで、ガス小胞形成機構の解明を目指した¹¹⁾。その結果、19の遺伝子のうち、*gvpA1*, *gvpA2*, *gvpA3*, *gvpF1*, *gvpF2*, *gvpF3*, *gvpG*, *gvpK*, さらに *gvrA*, *gvrB* がガス小胞形成に必須であることが示された。GvpA1 は他のガス小胞形成微生物の GvpA と相同性をもっとも高く、ガス小胞の主要タンパク質と考えられる。また、ハロアーキアのガス小胞解析の報告をふまえると¹³⁾、GvpA1 に加えて、GvpA2, GvpA3 と3種類の GvpF がガス小胞の構成成分であり、GvpG ならびに GvpK がガス小胞のアセンブリーに関与していると考えられる。GvpC はシアノバクテリアやハロアーキアの研究によりガス小胞の表層構成因子であり、構造安定性に関与することが知られている¹³⁾。本菌のガス小胞形成に GvpC は必須でないものの、欠損させると細胞の極部にガス小胞が確認された(図4)。また、*gvpC* 欠損株では野生株に比べて外部圧力に対して不安定であったことから、本菌においても GvpC は小胞の安定性に関与していると考えられる。

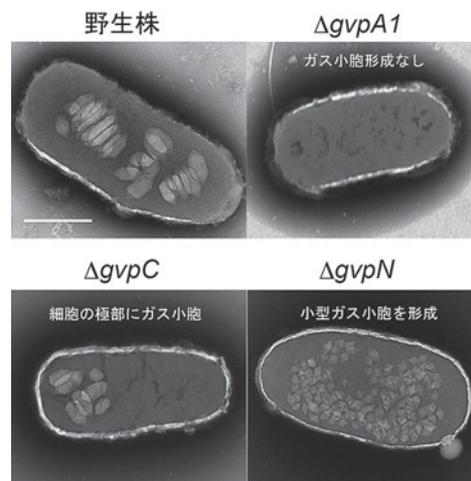


図4. *Serratia* sp. 野生株ならびに欠損株における透過電子顕微鏡写真図。バーは500 nmを示す。

*gvpN*あるいは*gvpV*の欠損株では、レモンの形状をした小型ガス小胞が形成された(図4)。GvpNは他のガス小胞形成微生物にも存在しているが、その機能の詳細は明らかになっていない。またGvpVはプロテオバクテリアにしか存在しておらず、その機能は未知である。本菌の結果から踏まえると、両因子はガス小胞の伸長に関わるシャペロンとしての機能を果たしていると考えられる。GvpHはハロアーキアではガス小胞の構成タンパク質として示されているものの¹³⁾、*Serratia* sp.では欠損株で顕著な変化が見られなかった。GvpW, GvpX, GvpY, GvpZについても欠損株では顕著な変化は見られず、これらの機能は未知である。

本菌は既知のガス小胞形成微生物と異なり、ガス小胞形成制御因子GvrA, GvrB, GvrCを保有する。GvrAは σ^{54} 依存的なNtrCファミリーの転写制御因子、GvrBはNtrBファミリーの転写制御因子であり、GvrCはべん毛の回転を制御するCheYと相同性が高い。*gvrA*あるいは*gvrB*の欠損株ではガス小胞形成が完全に見られなく、*gvrC*欠損では顕著なガス小胞形成抑制が確認された。いずれの欠損株においても*gvpA1*の転写が抑制されていたことから、これらはガス小胞を正に制御する転写因子として機能している。本菌のガス小胞形成は*gvpA1*から始まるleft gene clusterと*gvrA*から始まるright gene clusterに分けられ、それぞれは別々の転写ユニットとなっているが、Gvrをコードする遺伝子はいずれも最後に位置する(図2)。*gvpA1*の転写は定常期初期から開始するのに対し、*gvrA*の転写は対数増殖期中期から発動することから、right gene clusterに位置する遺伝子産物がガス小胞の初期タンパク質であると考えられる。

以上のことから、*Serratia*細菌のガス小胞形成推定モ

デルは図5となる。まず、right gene clusterの遺伝子産物であるGvpH, GvpF2, GvpF3が初めに合成され、ガス小胞構成成分である3種のGvpAとGvpF1が次に合成され、GvpGやGvpKによって小型ガス小胞が形成される。その後、GvpNやGvpVにより小胞が伸長し、GvpCが外殻を覆うことで圧力に安定なガス小胞が形成されると考えられる。

ガス小胞の生物工学的利用

ワクチン ガス小胞は生体適合性があり、安定性に優れ、免疫原性が高いことから、ワクチンへの利用が期待されている。ガス小胞の構成成分であるGvpCは小胞表層に局在するため、GvpCのC末端に特定のエピトープを含むように発現させる生物工学的技術が開発されてきた。特に高度好塩菌であるハロアーキアは、ガス小胞形成遺伝子がプラスミドに存在するため遺伝子操作がしやすく、塩濃度が低い溶液で溶菌するためガス小胞の抽出が簡便であり、本菌のガス小胞はワクチン開発に非常に適している。DasSarmaらは、サル免疫不全ウイルスのペプチドをガス小胞表層に提示させ、マウスを用いた免疫反応のスクリーニングに利用している¹⁸⁾。このような組換えガス小胞の利用は、簡便で安価に抗原性の評価を行うための新規手法として期待できる。

ナノバブル ガス小胞は外殻がタンパク質で構成された微小気泡であることから、安定なナノバブルとして新しい応用への展開が期待できる。Sundararajanらは、動物細胞培養での酸素供給源としてガス小胞が有用であることを示した¹⁹⁾。シアノバクテリアのガス小胞をグルタルアルデヒドで固定化し培養細胞に添加したところ、非添加条件に比べて最大で30%の細胞のグルコース消

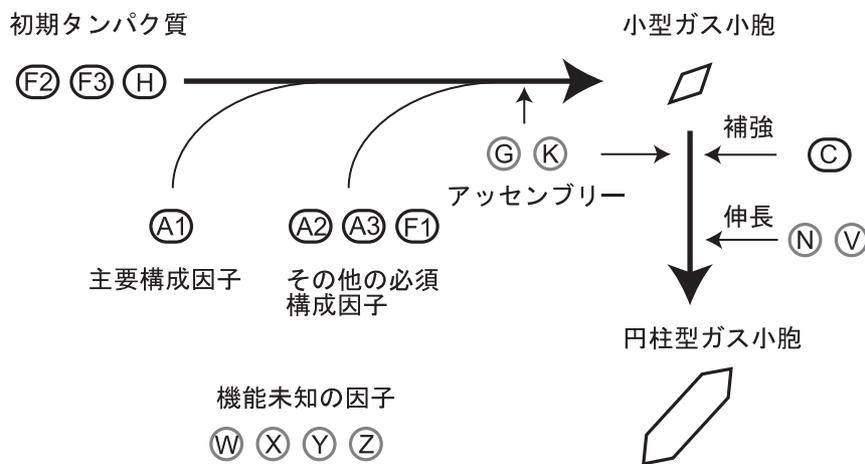


図5. *Serratia* sp.におけるガス小胞形成の推定モデル。黒い楕円は推定ガス小胞構成因子、グレーの丸はその他のGvpタンパク質を示す。

費の増加が見られた。一方、Shapiroらはガス小胞の音響特性に着目し、超音波造影剤として有用であることを示した²⁰⁾。さらに同グループは、¹²⁹Xeをガス小胞の中に封入させることにより、核磁気共鳴イメージング(magnetic resonance imaging: MRI)におけるプローブとしても有用であることを報告した²¹⁾。これまでは¹Hが主にMRIのプローブとして使われてきたが、水や生体分子のバックグラウンドとの区別が困難であった。ガス小胞を用いた¹²⁹Xe MRIはその欠点を克服し、生体深部の高解像度での可視化に大きく貢献すると考えられる。

おわりに

ガス小胞の遺伝子的ならびに生物物理学的解析は長年行われてきたものの、その形成機構には未解明な点が多いのが現状である。近年の急速なゲノム解析により、ガス小胞形成遺伝子はさまざまな微生物種に保存されていることが明らかになってきた。特に本稿で紹介した *Serratia* sp. は、シアノバクテリアやハロアーキアなど従来研究されてきたガス小胞形成微生物とは異なる特徴を持ち、より複雑な形成機構ならびに転写制御機構を有している。ガス小胞形成による垂直移動はエネルギーを直接消費しない運動形態であることから、本菌のように外部環境に応じてべん毛運動とガス小胞形成を使い分ける制御機構は、効率良く水圏を移動しニッチを獲得する微生物生存戦略に大きく寄与していると考えられる。

また、ガス小胞は生体親和性が高く安定性の高いナノバブルであることから、さまざまなナノバイオテクノロジーへの応用の可能性を秘めている。特に *Serratia* sp. が形成するガス小胞は、他の微生物が形成するガス小胞に比べて多くのタンパク質から構成されており、複雑な構造と推察されることから、新たな機能を保持した

ナノ構造体として有望かもしれない。本菌のガス小胞形成機構解明により、微生物運動機構の一端が紐解かれるだけでなく、新たなナノバイオテクノロジーの進展につながることを期待したい。

謝 辞

本研究は、ケンブリッジ大学George Salmond教授との成果であり、深く感謝いたします。本稿で紹介した内容の一部は、科学研究費新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」(JP15H01315)の支援を受けて達成されたもので、御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 曾和義幸・笠井大司: 生物工学, **96**, 183 (2018).
- 2) 伊藤政博: 生物工学, **96**, 187 (2018).
- 3) 西山雅祥ら: 生物工学, **96**, 191 (2018).
- 4) 中村修一: 生物工学, **96**, 195 (2018).
- 5) 宮田真人: 生物工学, **96**, 200 (2018).
- 6) 福島俊一・春田伸: 生物工学, **96**, 240 (2018).
- 7) 中根大介・西坂崇之: 生物工学, **96**, 244 (2018).
- 8) 田岡東・福森義宏: 生物工学, **96**, 248 (2018).
- 9) Walsby, A. E.: *Microbiol. Rev.*, **58**, 94 (1994).
- 10) Ramsay, J. P. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14932 (2011).
- 11) Tashiro, Y. *et al.*: *Environ. Microbiol.*, **18**, 1264 (2016).
- 12) Monson, R. E. *et al.*: *Microbiology*, **162**, 1595 (2016).
- 13) Pfeifer, F.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 705 (2012).
- 14) Konopka, A. E. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **122**, 1301 (1975).
- 15) Li, N. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **180**, 2450 (1998).
- 16) van Keulen, G. *et al.*: *Trends Microbiol.*, **13**, 350 (2005).
- 17) Edwards, A. N. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **80**, 1561 (2011).
- 18) DasSarma, S. *et al.*: *Vaccines*, **3**, 686 (2015).
- 19) Sundararajan, A. *et al.*: *Cytotechnology*, **52**, 139 (2006).
- 20) Shapiro, M. G. *et al.*: *Nat. Nanotechnol.*, **9**, 311 (2014).
- 21) Shapiro, M. G. *et al.*: *Nat. Chem.*, **6**, 629 (2014).