

細菌間情報伝達のデジタル化

森永 花菜・鬼澤 里奈・野村 暢彦・豊福 雅典*

はじめに

多くの細菌はシグナル分子を介してお互いにコミュニケーションをとっている。シグナル分子にはさまざまな種類のものがあり、実際のところ、それぞれがどのように伝達されるかについては未解明な部分が多い。特に、疎水性が高いシグナル分子について、どのように細胞外に放出されて周囲の細胞まで届くのか分かっていなかった。筆者らは、グラム陰性細菌でもっとも報告例が多いシグナル分子の一種であるアシル化ホモセリンラクトン類 (AHL 類) に着目し、メンブレンベシクル (MV) を介した AHL のシグナル伝達を見いだした。

AHL を介した細菌間シグナル伝達

多くの細菌は低分子化合物を介してお互いにコミュニケーションを行い、遺伝子発現を調節している。特に、細胞外に存在するシグナル分子の濃度が閾値に達した際に遺伝子発現制御が行われる機構をクォラムセンシング (QS) と呼び、多くの細菌が QS を介して集団としての挙動を変化させている¹⁾。たとえば、1970年代に最初に発見された *Vibrio fischeri* における微生物発光や²⁾、日和見感染細菌として知られる *Pseudomonas aeruginosa* における病原因子などが QS によって制御されている³⁾。シグナル分子として、グラム陰性細菌においては *N*-acyl homoserine lactone (AHL) がもっとも報告例があり、ヒトの言語のように菌種によって多様な AHL が使い分けられている。環境中から AHL 生産菌として数百種の細菌が単離されており、ゲノム情報からは、150 以上の細菌種が AHL 合成遺伝子のホモログを保持していることが示唆されている⁴⁾。化学構造上、AHL は共通のホモセリンラクトン環を有し、アシル基の長さや飽和度によって、多様性が生じ、それぞれの AHL にはそれらを認識するレセプタータンパク質が存在することで、言語が聞き分られている¹⁾。多くの場合、シグナル合成遺伝子およびレセプタータンパク質をコードする遺伝子はそれら自身により正の制御を受けている。これにより、ポジティブフィードバックが起こることで、菌体密度が閾値以上に達すると QS が一気に活性化される。

これまでに、AHL は C4 から C18 の側鎖を持つものが

報告されてきた。そのうち、側鎖が短い、短鎖 AHL は細胞膜を自由拡散で通過できるのに対し、長鎖 AHL がどのように細胞外に放出され、水環境中で分散するかについては分かっていなかった。長鎖 AHL が細胞膜に蓄積する、との報告があることから、筆者らは、AHL を放出する機構として、MV に着目した。

メンブレンベシクル

MV とは細菌の細胞膜から成る直径約 20–400 nm の膜小胞で、1960 年代に電子顕微鏡で観察されて以来、グラム陰性菌、陽性菌に関わらず、多くの細菌でその生産が報告されている^{5,6)}。MV には膜成分だけでなく、核酸やタンパク質、シグナル分子、毒素など細菌由来のさまざまな成分が内包されている。MV でこれらが濃縮されることによって、より細胞間で安定して伝わりやすくなると考えられる。そのため、MV は遺伝子の水平伝播や毒素の運搬など、細菌間や細菌–宿主細胞間相互作用において重要な役割を担っていることが明らかとなってきた⁷⁾。近年では、膜タンパク質を細胞間で交換することで、ファージへの感受性を付与できることも明らかとなり、今後もさまざまな機能が見いだされると期待される。さらには、物質循環やファージからの防除などに MV が関わっていることが報告され、生態系の維持に関わっていることが分かりつつある。実際に、環境中からも MV が同定されており、細菌の凝集体であるバイオフィーム中に観察されたほか、海洋や活性汚泥からも同定されている。MV はその特性上、ワクチンやガン細胞をターゲットとしたドラッグデリバリーシステム、酵素の連続反応を行わせるナノカプセル工場の開発にも利用され、今後さらなる産業や医療への応用も期待されている。

メンブレンベシクルを介した細菌間シグナル伝達

Paracoccus denitrificans は完全脱窒を行う細菌で活性汚泥などに生息する。また、表層タンパク質 (BapA) を介して基質表面に付着し、バイオフィームを形成することが明らかとなっている⁸⁾。この細菌は疎水性が高いシグナル分子 (C16-HSL) を産生し、それらの多くが細胞膜に蓄積することが報告されていた⁹⁾。 *P. denitrificans*

*著者紹介 筑波大学 生命環境系 E-mail: toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp

以外で長鎖 AHL を利用する細菌においても、そのシグナル分子が細胞膜に蓄積することが確認されており、こうしたシグナルがどのようにして周囲の細胞に伝達されるのかについては未解明のままとなっていた。筆者らは、MV を介して C16-HSL が放出されるのではないかと考え、*P. denitrificans* の MV 生産能を調べたところ、培養液の上清中に数十 nm の MV が放出されていることを確認した¹⁰⁾。

MV にシグナル分子が含まれるのか調べたところ、MV には C16-HSL が含まれており、その C16-HSL は細胞に伝達されることが明らかとなった。*P. denitrificans* の C16-HSL 合成遺伝子 (*pdnI*) を同定し、破壊株を作製すると、*pdnI* 破壊株は強凝集能を有することが明らかとなった。つまり、C16-HSL は *P. denitrificans* の凝集を抑制していた。*pdnI* 破壊株に wild-type (WT) の培養液から回収した MV を加えたところ、凝集が C16-HSL 同様に抑制され、*pdnI* 破壊株の培養液から回収した MV では変化がなかった。これらの結果より、MV により運搬される C16-HSL は細胞に伝達され、シグナル分子としての役割を果たすことが明らかとなった。

これまでの研究によって、*P. aeruginosa* のみで産生される、*Pseudomonas* quinolone signal (PQS) が MV によって運搬されていることが報告されていたが¹¹⁾、C16-HSL は PQS と比較しても疎水性が高い。また、前述したように、AHL 類はこれまでもっとも多く細菌で報告されているシグナル分子であるため、筆者らの発見は、MV による疎水性シグナル分子の運搬が一般的であることを示唆した。

メンブレンベシクルによるシグナルのデジタル化

QS において重要なのは、一細胞あたりのシグナル分子の数が閾値を超えることである。QS においてシグナル分子量の閾値が存在し、ある一定濃度のシグナル分子が蓄積すると、遺伝子発現調節が行われる。定量の結果、*P. denitrificans* におけるこの閾値量は 1 細胞あたり、3–350 分子（この幅は、C16-HSL の分散具合による）であることが分かった¹⁰⁾。MV をどれくらい受け取れば、遺伝子発現の制御が行われるのか、それを算出するために、MV に含まれるシグナル分子量を定量した結果、シグナル分子が MV に等量含まれると仮定して、MV 粒子一つあたり 10^5 分子もの C16-HSL が運搬されていることが明らかとなった。1 粒子に含まれる C16-HSL がすべて 1 細胞に受け渡されるかどうかは、今後解析を行う必要があるが、細菌間コミュニケーションを会話であると例えるなら、もはやこのシグナル分子量は耳元で叫ん

でいる状態である。

古典的な QS モデルでは、シグナル分子は自由に拡散して、連続的にシグナルが伝達されると想定されており（アナログなシグナル伝達）、その結果、その場にいる集団の遺伝子発現を同調させると考えられてきた。また、シグナル分子の量に応じて、遺伝子発現も連続的に制御される。一方で、MV を介したシグナル伝達では、シグナルが MV の数に応じてとびとびに伝わる（デジタルなシグナル伝達）。その結果、MV を受け取った細胞でのみ遺伝子発現制御が行われることが考えられる¹⁰⁾。MV にシグナル分子が濃縮されることによって、細胞間コミュニケーションのあり方が変わってくるのである。

環境中でのシグナル伝達

QS には遺伝子発現を制御するためのシグナル分子濃度の閾値が存在する。しかしながら、シグナル分子が無限希釈されるような実環境中で、どのようにしてシグナル分子が閾値に達するかについては未だに明らかになっていない。こうしたなかでも、細胞の外側がマトリクスで覆われているバイオフィルムが QS の行われる場として想定されているが、それ以外については、よく分かっていなかった。今回の筆者らの成果は、MV にシグナル分子が濃縮されていることを明らかにしており、閾値の問題を解決できる。

さらに、C16-HSL が MV によって運ばれることで、長距離間でのシグナル伝達も可能になると思われる。C16-HSL 単体の場合は、細胞から離れるにつれて、シグナル濃度が希釈されて、ついには閾値を下回る。一方で、MV の場合は、細胞から離れるにつれて MV を受け取る確率は低くなるものの、MV を受け取りさえすれば、遺伝子発現の制御がおこることが想定される。MV によるシグナル伝達を考えることで、実環境中での QS を理解する一つの手がかりになるかもしれない。

メンブレンベシクルによるシグナルの交通整理

さて、MV にシグナル分子が含まれる利点は、濃縮効果だけではない。筆者らの研究によって、シグナルの交通整理が行われることが明らかとなった。つまり、二種の細菌が混在する状況で、同種にシグナル分子が伝達されるのである。*P. denitrificans* の MV は *P. denitrificans* が一番付着しやすく、細菌種によってその程度の差はあるものの、*Pseudomonas* 属細菌への付着性はきわめて低かった¹⁰⁾。シグナル分子の単純拡散では、シグナルの受容体があるかどうかに関わらず、その場にいる全細胞にシグナルが行き渡るが、MV を介すことで、より伝えた

い相手にシグナルが伝わる。古典的なQSは声で語りかけるのに対し、MVを介したQSは手紙でメッセージを伝えるようなものではないだろうか。MVの付着特異性を決定する要因は解析中だが、*Buttiauxella agrestis*においては表面の電荷が重要との報告もある¹²⁾。こうした現象は、基礎的にも興味深いだけでなく、ドラッグデリバリーシステムの開発などにも役立てられると思われる。

メンブレンベシクル形成機構

2016年には当研究室の先行研究におけるMVの形成機構に関して、従来考えられてきた膜が隆起することにより形成されるblebbingに加え、細胞が破裂した際に膜断片が丸くなることで形成されるexplosive cell lysis (ECL) と呼ばれる新たな機構を、*P. aeruginosa*において発見した¹³⁾。ECLを誘発するのは、エンドリシンと呼ばれる細胞壁分解酵素であり、これはdsDNAファージが宿主を溶菌させて細胞外に出て行く際に用いられている。そのため、エンドリシンは細菌間で保存性が高く、2017年にはグラム陽性細菌におけるMV形成機構にもエンドリシンが関わることを明らかにした¹⁴⁾。*P. denitrificans*にもエンドリシンがプロファージ領域近傍に保存されており、プロファージを誘導することで、MV生産が増加することが明らかとなっている。その際に、プロファージの誘導を制御しているRecAを欠損させるとMV生産の増加は観察されなくなった¹⁰⁾。さらに、プロファージを誘導すると、MV生産の増加に伴って、細胞外に放出されるC16-HSL量も上昇する。これらの現象に関するエンドリシンの関与は解析中であるものの、プロファージが細菌のコミュニケーションに介在する可能性を示している。

最後に

細菌間のコミュニケーションの分子メカニズムについてその詳細が研究されている一方で、細胞間でシグナルがどのように伝わるのかについて、特に疎水性のシグナル分子について、これまでにあまり解析されてこなかった。細胞間でのシグナル伝達は、コミュニケーションが成り立つための根幹の部分であり、今後の研究の課題である。筆者らはその中でも、MVの役割を解析することによってデジタルなシグナル伝達という新たな概念を提唱するに至った(図1)。シグナルのデジタル化は、既存

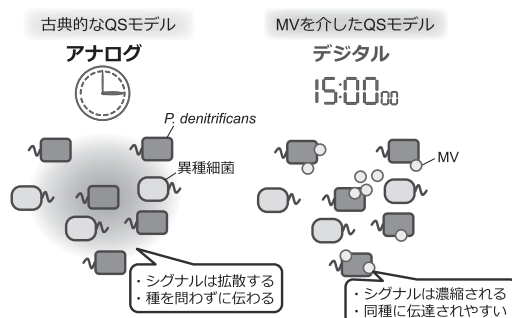


図1. 古典的なQSモデルとMVを介したQSモデル

のQS機構とはシグナル伝達様式が根本的に異なる。それらが、生物学的にどのような意義を持つのか、現在解析中である。加えて、*P. denitrificans*においては、MVにもシグナル分子のキャリアーが存在することも示唆されており、一つのシグナル分子でも伝わり方が異なっていることが考えられる。こうした現象を理解することで細菌間コミュニケーションの実際を理解できると思われる。

謝 辞

本稿における成果の一部は、科学研究費助成事業と戦略的創造研究推進事業の助成を受けて実施されたものです。

文 献

- 1) Fuqua, W. C. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **176**, 269 (1994).
- 2) Neilson, K. H. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **104**, 313 (1970).
- 3) Pearson, J. P. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 197 (1994).
- 4) Churchill, M. and Chen, L.: *Chem. Rev.*, **111**, 68 (2011).
- 5) Brown, L. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 620 (2015).
- 6) Schwegheimer, C. and Kuehn, M. J.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 605 (2015).
- 7) Toyofuku, M. *et al.*: *Adv. Colloid Interface Sci.*, **226**, 65 (2015).
- 8) Yoshida, K. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **364**, doi:10.1093/femsle/fnx029 (2017).
- 9) Schaefer, A. L. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **184**, 6515 (2002).
- 10) Toyofuku, M. *et al.*: *ISME J.*, **11**, 1504 (2017).
- 11) Mashburn, L. M. and Whiteley, M.: *Nature*, **437**, 422 (2005).
- 12) Tashiro, Y. *et al.*: *Front. Microbiol.*, **8**, 571 (2017).
- 13) Turnbull, L. *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 11220 (2016).
- 14) Toyofuku, M. *et al.*: *Nat. Commun.*, **8**, 481 (2017).