

## メンブレンベシクルを介した微生物間相互作用

豊福 雅典

自然界の細菌は、複数の細菌種が混在する複合系として存在し、その中で生じる多様な相互作用のなかで生活しているが、その全容は未だに明らかになっていない。近年では、菌体外に産生される化合物を介した相互作用の他に、分泌システムなどを介した細菌同士の接触を伴う新たな機構も次々に明らかになっており、細菌の生存戦略において相互作用が多様化してきた様子が窺える。

細菌間相互作用の中で、多くの細菌が共通して保持している機構として注目されているものが、メンブレンベシクル (MV) である。MVは直径20～400 nm程度の細胞外に放出される細胞膜小胞で、細胞構造が異なるグラム陰性細菌、グラム陽性細菌で広く産生される<sup>1)</sup>。

MVは多様な機能を持っており、遺伝子の水平伝播や抗生物質耐性に関わる他、細菌-宿主間相互作用に関しても、毒素因子の運搬など重要な働きを担っていることが明らかになってきている。さらに、MVの性質を利用したワクチン開発や新たな酵素の固定技術など、応用研究についても盛んに行われている。MVの細胞間コミュニケーションにおける役割については、MVに疎水性のシグナル化合物が濃縮されることを筆者らは明らかにしており<sup>2)</sup>、その詳細については、本誌の第96巻第8号の特集に「細菌間情報伝達のデジタル化」として紹介させていただいた<sup>3)</sup>。MVによってシグナル伝達様式が大きく変わることを明らかにしたので、ご興味がある方は上記記事をご参照願いたい。これまで筆者らは、MVの機能や形成機構に着目した研究を行っており、グラム陰性菌とグラム陽性菌に共通したMV形成機構を明らかにした。その成果により、MVにはいくつかの形成機構が存在し、異なるタイプのMVが生じる可能性が分かってきたので紹介させていただく。

### Blebbingによる古典的なMV形成機構

MVは1960年代に電子顕微鏡を使った観察によってその存在が確かめられ、当初はグラム陰性菌である大腸菌を中心に研究が進められた。グラム陰性菌は、外膜を有するため、外膜がたわむblebbingによりMVが形成されると長い間考えられてきた。Blebbingを誘導する機構はいくつか提唱されており、ペプチドグリカンに対

する細胞膜の過剰生産、化合物の挿入による外膜の湾曲、内膜と外膜の架橋の消失、ペリプラズムへのミスフォルディングタンパク質の蓄積による膨圧の発生、などがあげられる<sup>1)</sup>。化合物の挿入に関する代表的な例を示すと、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) が産生する細菌間コミュニケーション化合物の一種である *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) がリポ多糖 (LPS) と結合することで、LPS分子同士の反発力が強まり、膜が湾曲し、MVが形成される機構が考えられている。少し本題から逸れるが、PQSはシグナル化合物として働く以外に、呼吸を直接的に阻害する活性を持ち<sup>4)</sup>、鉄もキレートするなど、さまざまな機能を有している。BlebbingによるMV形成機構の中でユニークなものとして、鞭毛が膜で覆われている *Aliivibrio* 属細菌の、鞭毛の回転によるMV形成があげられる<sup>5)</sup>。形成されたMVは宿主のイカ (*Euprymna scolopes*) の発光器の形態形成を誘導することが知られており、MVが宿主に影響を与える究極的な例の一つといえるだろう。

BlebbingモデルがMV形成機構のドグマとして長らく受け入れられてきたが、どのようにしてMVに核酸などの細胞質内の物質が内膜を通り越して、外膜に包まれるかについては説明できないままだった。また、グラム陽性菌においては、blebbingによってMVが形成された場合にどのようにしてMVが細胞壁を通過するのかについて、解明できていなかった<sup>6)</sup>。Blebbingモデルにおいては、細胞が生きたままMVを形成することが想定されており、生細胞からの形成はMVの定義にも使われていたが<sup>7)</sup>、最近筆者らはこれらの知見を覆す成果を得ることができた。

### グラム陰性菌の新規MV形成機構

新たな知見を得るきっかけとなったのは、ライブセルイメージングである。細胞を破壊して解析する分子生物学的手法や生化学的手法は、目的の現象に関わる因子を同定するために強力である一方で、それらの因子がどのように関わりあって、細胞レベルでその現象が進行するのかについては推察する必要がある。MV研究においても、MV形成に関わる因子が同定されていたが、実際に

どのようにそれらがMV形成を促しているかについて、推論の域を出ていなかった。筆者らは*P. aeruginosa*を用いたライブセルイメージングによりMVが形成される瞬間を捉えたところ、細胞が溶菌し、その膜断片が再会合することでMVが形成されることが明らかとなった<sup>8)</sup>。細胞が破裂しながら溶菌する様子から、本現象をexplosive cell lysis (ECL)と名付け、blebbingとは根本的に異なるMV形成機構を提唱した(図1)。本過程では細胞が溶菌して、核酸がMVに包括される様子も観察され、細胞質内物質がMVへ包括される方法についての知見も得られた。

本機構を解析したところ、細胞壁の分解酵素であるエンドリシンによってECLが誘発されることが明らかとなった<sup>9)</sup>。エンドリシンはDNA二本鎖ファージが宿主を溶菌する際に用いる酵素であり、溶原化したテンプレートファージとして多くの細菌宿主ゲノムに組み込まれている。*P. aeruginosa*においては、通常の培養条件で集団全体の1%未満でのみ発現している。したがって、一部の細菌が溶菌しても集団中の他の細胞がその利益を享受できる。それを示す例として、ECLによってMVとともに細胞外にDNAが放出されるが、放出された細胞外DNAがバイオフィーム形成において細胞同士を凝集させるための細胞外マトリクスとして働くことを明らかにした<sup>8)</sup>。つまり、ECLが*P. aeruginosa*の集団形成にも関与している。筆者はECLの解析に先立ち、*P. aeruginosa*バイオフィームの細胞外マトリクスをプロテオーム解析によって網羅的に同定していたが、その結果は細胞外マトリクスにMVが多く含まれることを示していた<sup>9)</sup>。今回ECLによってMVと細胞外DNAの放出が同時に起こることを新たに見だし、過去のプロテオーム解析結果を裏付ける結果となった。

### グラム陽性細菌のMV形成機構の解明

グラム陽性菌におけるMVの報告例が年々増える一方で、MV形成機構についての知見が皆無であった。というのも、グラム陽性菌では、膜の外側が分厚い細胞壁に覆われており、MVがどのようにしてその細胞壁を通るのが説明できなかった。多くの研究者は、細菌が生きたままの状態を放出するのをMVと定義していたが、筆者らはECLの発見によって、細胞死を介したMV形成機構もあることを明らかにし、MVを今までと違う形で捉えていた。さらに、*P. aeruginosa*でECLを誘発するエンドリシンをコードする遺伝子はファージ由来するため、細菌間できわめて保存性が高く、グラム陽性菌においても広く保持されている。エンドリシンは抗菌剤とし

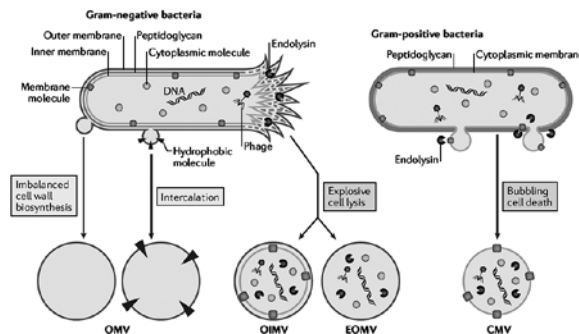


図1. 多様なMVの形成機構と種類<sup>11)</sup>。MVの形成経路により、outer membrane vesicle (OMV), outer-inner MV (OIMV), explosive OMV (EOMV)とcytoplasmic MV (CMV)が形成され、中身が異なることが予測される。

ても利用されており、エンドリシンで処理されたグラム陽性菌の電子顕微鏡写真からは、まさにMVを形成しているような細胞の様子が観察された<sup>10)</sup>。こうしたヒントから、筆者らはグラム陽性菌でもエンドリシンによってMV形成が誘導されているとの確信を持つに至った。

それを検証するために、枯草菌(*Bacillus subtilis*)を用いて研究を進めた。その結果、*B. subtilis*においてもゲノムに存在するプロファージ由来のエンドリシンがMV形成に関わることを明らかにした<sup>12)</sup>。ライブセルイメージングの結果からは細胞死を伴いながらMVが形成される*B. subtilis*の様子が観察された。その様子は、*P. aeruginosa*とは異なり、*B. subtilis*は破裂せずに形を保ったままMVを放出していた。そこで、細胞壁の微細構造をクライオ電子線トモグラフィー法によって観察したところ、エンドリシンの作用によって細胞壁に穴が空いて、その穴から膜が押し出される形で、MVが形成されることが明らかとなった(図1)。また、一度MV形成が開始されると連鎖反応のように、MV形成が細胞間で連続的に起きることも明らかとなった。周囲に細胞壁が露出しているグラム陽性菌の場合は、一度放出されたエンドリシンが細胞の外側からも細胞壁を分解し、MV形成を誘導するものと考えられる。

以上のように、*B. subtilis*においてもエンドリシンによる細胞壁の分解がMV形成を誘導することが明らかとなり、ECLとの形成過程との違いから、bubbling cell death (BCD)と名付けた。BCDは現在のところ、グラム陽性菌で報告されている唯一のMV形成メカニズムであり、細胞壁の損傷がMV形成の鍵であることを示している。

### エンドリシンを利用したMVの改良技術

エンドリシンの誘導によってMV形成が誘導できることから、多くの細菌においてもMVの大量調製に利用で

きる可能性がある。MVはワクチン開発やドラッグデリバリーシステムの基盤技術として、その応用が期待されているが、どのようにしてMVを大量に調製するかが一つの課題となっている。多くの細菌はエンドリシンをゲノムに保持しているが、保持していない株に対しても、テンプレートファージの溶原化によって宿主ゲノムに組み込むことができ、MV誘導株の作製がたやすい。現在はさらにECLの特徴を利用して、MVに任意の積荷を搭載できるシステムを筆者らは開発しており、MVの大量調製および改良技術基盤を構築中である。

### 将来に向けて

MVの形成機構が明らかになるにつれ、MVの多様性が明らかとなってきた(図1)<sup>11)</sup>。MVは生産機構に依存して、いくつかの種類に分類でき、種類ごとにその中身、さらには機能が変わってくるが示されている。しかしながら、従来、MVは一緒くたにされ、個々のMVの性質については着目されていなかったため、それぞれの粒子の本当の機能は平均化され、集団のなかで埋もれてしまっている可能性が高い。たとえば、細菌間コミュニケーションにおいては、MVたった1粒子によって細胞の遺伝子発現を制御できることが示唆されており、MV1粒子の潜在能力が示されている<sup>2)</sup>。こうした背景から、MVの機能の真の理解に向けた1微粒子解析に金沢大学の田岡東先生や関西学院大学の重藤真介先生らとともに取り組んでいる。

また、MV形成機構についての知見が蓄積してきた一方で、どのようにしてMVの中身が細胞に受容されるかについてはほとんど分かっていない。今後は、MVと細胞の相互作用の理解がMVの機能性を理解するうえで鍵となってくる。

最後に、我々は日々細菌に囲まれながら生活しているが、細菌が存在するところには、MVが存在すると言っても過言ではない。MVは免疫誘導性を有し、ミトコンドリアに直接働きかける例も明らかになっており<sup>13)</sup>、ヒトへの影響は良い面と悪い面を含めて、ほとんどが未知である。野村集団微生物制御プロジェクトでは、尾花望先生らが、ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)のMVが宿主細胞の炎症性サイトカイン生産を誘導する活性を

有することを見いだした<sup>14)</sup>。本菌のMVを宿主に接種するとウェルシュ菌特異的な抗体産生を効率的に誘導することから、ワクチン開発のプラットフォームとして利用できる可能性を示している(Obanaら投稿準備中)。本菌のMV産生にはグローバルな転写因子が必要であり<sup>14)</sup>、この転写因子の発現および活性を増強させることでMV生産量を向上させることが可能である(文献14および未発表データ)。

MVワクチン開発を含め、こうしたMVの働きを理解し、制御・利用することで、我々はその大きな恩恵に預かれる可能性が見えてきた。MV研究に対する基礎および応用研究への関心が世界的に高まっている背景をうけ、2021年11月24–26日に“Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and medical applications”と題して、MVに関する初の国際学会をEMBO(欧州分子生物学機構)ワークショップとして、つくばで開催することになった。2020年の開催予定が1年延期したわけだが、開催される折には、ご興味がありましたら奮ってご参加ください。

### 謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科研費およびJST ERATO野村集団微生物制御プログラム(JPMJER1502)により実施したものであり、ここに厚くお礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Toyofuku, M. *et al.*: *Adv. Colloid Interface Sci.*, **226**, 16 (2015).
- 2) Toyofuku, M. *et al.*: *ISME J.*, **11**, 1504 (2017).
- 3) 森永花菜ら: *生物工学*, **96**, 451 (2018).
- 4) Toyofuku, M. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **190**, 7947 (2008).
- 5) Aschtgen, M. S. *et al.*: *Cell Microbiol.*, **18**, 488 (2016).
- 6) Brown, L. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 620 (2015).
- 7) Schwechheimer, C. and Kuehn, M. J.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 605 (2015).
- 8) Turnbull, L. *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 11220 (2016).
- 9) Toyofuku, M. *et al.*: *J. Proteome Res.*, **11**, 4906 (2012).
- 10) Schuch, R. *et al.*: *Nature*, **418**, 884 (2002).
- 11) Toyofuku, M. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 13 (2019).
- 12) Toyofuku, M. *et al.*: *Nat. Commun.*, **8**, 481 (2017).
- 13) Deo, P. *et al.*: *PLoS Pathog.*, **14**, e1006945 (2018).
- 14) Obana, N. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **199**, e00703-16 (2017).