

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02866

研究課題名(和文)細菌の膜小胞を介した物質受け渡し機構の解明

研究課題名(英文)Delivery of cargo in bacterial membrane vesicles

研究代表者

豊福 雅典 (Toyofuku, Masanori)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：30644827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ほとんどの細菌は多様な機能を持つ細胞外膜小胞(メンブレンベシクル(MV))を放出する。MVが細菌間相互作用で機能を発揮するには、周囲の細胞にその積荷を受け渡すことが必須となる。MVの積荷が細胞に渡されていることは、数多くの研究例で実証されているにも関わらず、その詳細な過程やメカニズムについては全く理解されていなかった。本課題では、MVの受け渡し機構を解明するために、その機能性に影響を与えることが明らかとなってきた形成機構も踏まえて、解析を行った結果、MVの新たな機能とその受け渡しプロセスの一端について解明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MVはDNA、RNA、タンパク質、シグナル化合物などを運搬することで、遺伝子の水平伝播や細菌間コミュニケーション、抗生物質耐性等、多くの機能を併せ持ち、細菌の進化や生存戦略の根幹にも関わる。さらには、MVは生物材料としても非常に注目され、創薬などで新たな分野を切り拓いている。本課題の成果によって、MVに関する基礎的な知見が得られて、それをターゲットにした、微生物利用、制御分野に新たな切り口を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Most bacteria release extracellular membrane vesicles (membrane vesicles (MVs)) that have diverse functions. However, the details of the MV cargo uptake in bacteria have not been fully understood. In this project, we aimed to elucidate the mechanism of MV delivery. Given that the MV formation routes impact the MV cargos, we also analyzed the MV formation mechanisms along with the function of the MVs. As a result, we were able gain insights in to how MVs are formed and the cargos are delivery to the targetting cells.

研究分野：微生物学

キーワード：メンブレンベシクル 微生物間相互作用 細菌間コミュニケーション ファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ほとんどの細菌は多様な機能を持つ細胞外膜小胞(メンブレンベシクル(MV))を放出する(3)。例えば、MV は細菌間での情報伝達(細菌間コミュニケーション)や遺伝子のやり取り(遺伝子水平伝播)などの細胞間相互作用や感染した動・植物細胞への毒素の運搬や抗生物質やウイルスから逃れるための防御機構、さらには、細菌の栄養獲得や地球全体の物質循環にも寄与していることが示されている。近年では、MV に任意の酵素を詰めたナノ触媒としての利用が注目されているほか、MV の免疫誘導性を利用したワクチンとして欧米ですでに認可されている。さらには、ガン細胞など特定の細胞をターゲットにした、薬物輸送システムの開発も行われている。

MV の中身の解析が進むにつれて、その機能が次々と明らかになってきている一方で、実際にそれらの中身がどれほど細胞に受け渡されているかについては、推測の域をでないものがほとんどである。MV の積荷が細胞に渡されていることは、数多くの研究例で実証されているにも関わらず、その詳細な過程やメカニズムについては全く理解されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、MV による物質受け渡しプロセスとそのメカニズムの理解を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、MV の物質受け渡しプロセスとそのメカニズムを理解するために、MV と細胞の相互作用をイメージングするシステムを構築した。さらには、相互作用を解析するために、MV の活性を追うための異なる局在を持つ MV のトレーサーを解析し、MV を介した物質の受け渡し機構プロセスの理解へと繋げることにした。

4. 研究成果

(1) イメージング

超解像顕微鏡を用いた MV のライブセルイメージング手法を構築した。MV は直径およそ 200nm 程度である。ライブセルイメージングにおいては、細胞を生きのまま固定できる条件を検討し、MV のみが細胞間を動けるように工夫した。その結果、MV が形成される瞬間のみならず

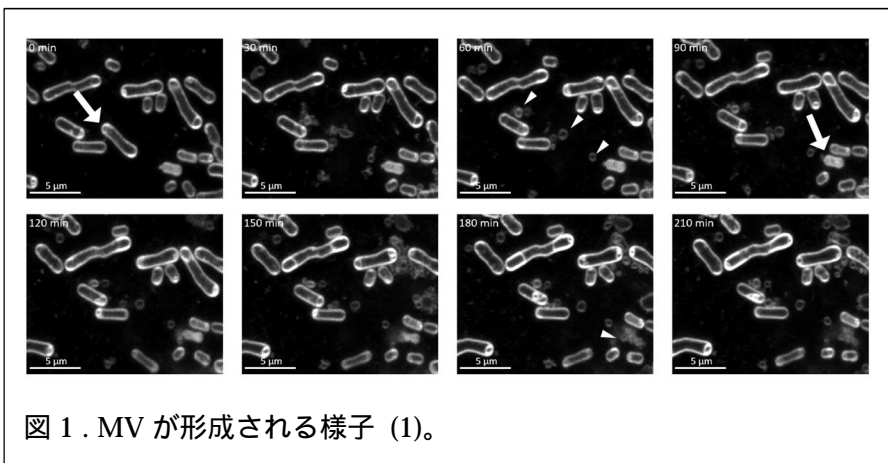


図 1. MV が形成される様子 (1)。

図 1)、MV が細胞に付着したのちに離れる様子や、細胞表層を転がる様子などが捉えられ、MV の動態を捉えるための技術基盤が構築できた。

(2) MV の形成機構および機能の解析

MV が細胞にどのように作用しているかを解析するにあたって、その機能を明らかにする必要がある。申請者のこれまでの成果により、MV の機能はその形成経路に大きく依存することが明らかになっている。そこで、様々な細菌において MV の形成経路と機能を解析した。その結果、同一菌種においても MV の形成経路依存的にその中身がどのように変化するのかについて、一定の知見が得られた。さらには、細胞のどこから MV が形成されるかも、MV の組成の決定に重要であることが明らかとなった(図 2)。加えて、MV を誘導する因子も新たに同定された。MV の機能についても、疎水性のシグナル化合物の伝達や鉄の運搬に関して新たに知見が得られた。さらに、これまでの研究成果から、MV が物質を濃縮して運搬することが明らかになり、その分泌様式を新たに「Quantal secretion」と名付けた(4)。

(3) 細胞と MV の相互作用の解析

上記で明らかにした MV に運搬される物質を、MV が細胞に受け渡されたかどうか追跡するためのトレーサーとして用いることで、MV と細胞の相互作用を解析した。その際には、MV の膜や内側にそれぞれ局在すると考えられるトレーサーを用いて、その受け渡しを解析した。トレーサー物質が細胞に受け渡されたかについては、イメージングやレポーター株、細胞の生育を指標に用いるなどして、検証した。その結果、細胞表面に MV が付着するのは、MV の中身の受け渡しには十分ではなく、細胞側に何らかの取り込み機構が存在することを示唆する知見が得られた。

(4) MV へのトレーサーの搭載の検討

MV の機能を担う物質をトレーサーとして用いるのに加えて、MV に人工的にトレーサーを封入するための検討をおこなった。その結果、様々な物質を MV に内包させることができる手法について基礎的な条件を選定できた。

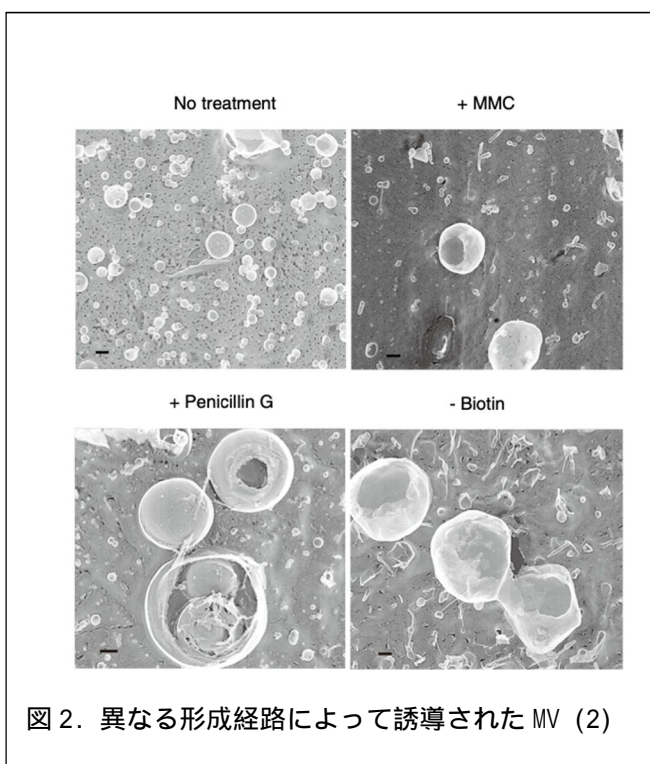


図 2. 異なる形成経路によって誘導された MV (2)

<参考文献>

1. Yasuda M, Yamamoto T, Nagakubo T, Morinaga K, Obana N, Nomura N, Toyofuku M. 2022. Phage Genes Induce Quorum Sensing Signal Release through Membrane Vesicle Formation. *Microbes Environ* 37.
2. Nagakubo T, Tahara YO, Miyata M, Nomura N, Toyofuku M. 2021. Mycolic acid-containing bacteria trigger distinct types of membrane vesicles through different routes. *iScience* 24:102015.
3. Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. 2019. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol* 17:13-24.
4. Toyofuku M, Schild S, Kaparakis-Liaskos M, Eberl L. 2023. Composition and functions of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol* doi:10.1038/s41579-023-00875-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Abe Kimihiro, Toyofuku Masanori, Nomura Nobuhiko, Obana Nozomu	4. 巻 23
2. 論文標題 Autolysis mediated membrane vesicle formation in <i>Bacillus subtilis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 2632 ~ 2647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1462-2920.15502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Naradasu Divya, Miran Waheed, Sharma Shruti, Takenawa Satoshi, Soma Takamitsu, Nomura Nobuhiko, Toyofuku Masanori, Okamoto Akihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Biogenesis of Outer Membrane Vesicles Concentrates the Unsaturated Fatty Acid of Phosphatidylinositol in <i>Capnocytophaga ochracea</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.682685	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koh Sangho, Sato Michio, Yamashina Kota, Usukura Yuki, Toyofuku Masanori, Nomura Nobuhiko, Taguchi Seiichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Controllable secretion of multilayer vesicles driven by microbial polymer accumulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-07218-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yasuda Marina, Yamamoto Tatsuya, Nagakubo Toshiki, Morinaga Kana, Obana Nozomu, Nomura Nobuhiko, Toyofuku Masanori	4. 巻 37
2. 論文標題 Phage Genes Induce Quorum Sensing Signal Release through Membrane Vesicle Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME21067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Y, Obana N, Toyofuku M, Kodera N, Soma T, Ando T, Fukumori Y, Nomura N, Taoka A	4. 巻 12
2. 論文標題 Diversity of physical properties of bacterial extracellular membrane vesicles revealed through atomic force microscopy phase imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 7950-7959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9nr10850e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morinaga K, Nagakubo T, Nomura N, Toyofuku M	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of membrane vesicles in long-chain-AHL delivery in <i>Paracoccus</i> species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environ Microbiol Rep	6. 最初と最後の頁 355-360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1758-2229.12843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vidailiac Celine, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Sex Steroids Induce Membrane Stress Responses and Virulence Properties in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01774-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagakubo, T., Tahara YO, Miyata M, Nomura N, Toyofuku M	4. 巻 24
2. 論文標題 Mycolic acid-containing bacteria trigger distinct types of membrane vesicles through different routes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.102015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toyofuku M	4. 巻 83
2. 論文標題 Bacterial communication through membrane vesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 1599-1605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1608809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagakubo T, Nomura N, Toyofuku M	4. 巻 10
2. 論文標題 Cracking open bacterial membrane vesicles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.03026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morinaga K, Yoshida K, Takahashi K, Nomura N, Toyofuku M	4. 巻 104
2. 論文標題 Peculiarities of biofilm formation by Paracoccus denitrificans and associated factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2427-2433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10400-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyofuku Masanori, Schild Stefan, Kaparakis-Liaskos Maria, Eberl Leo	4. 巻 -
2. 論文標題 Composition and functions of bacterial membrane vesicles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Reviews Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41579-023-00875-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen Yi-Chi、Kalawong Ratchara、Toyofuku Masanori、Eberl Leo	4. 巻 3
2. 論文標題 The role of peptidoglycan hydrolases in the formation and toxicity of Pseudomonas aeruginosa membrane vesicles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 microLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsml/uqac009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Masanori Toyofuku
2. 発表標題 Bacterial Interactions Through Membrane Vesicles
3. 学会等名 FEMS-ASM World Microbe Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masanori Toyofuku
2. 発表標題 Bacterial communication through MVs
3. 学会等名 EMBO workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 Applying single cell imaging to understand bacterial membrane vesicle transport
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 イメージングで捉える細菌の細胞外膜小胞輸送
3. 学会等名 第95回 細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 細菌における多様なMV形成機構
3. 学会等名 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 膜小胞を介した細菌間コミュニケーションの研究
3. 学会等名 日本微生物学連盟 野本賞 受賞講演 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 Bacterial Trafficking of Biomolecules Through Membrane Vesicles
3. 学会等名 Annual meeting of electrokinetic society Japan (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 メンブレンベシクル形成機構の多様性と普遍性
3. 学会等名 日本農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 Bacterial membrane vesicle formation through cell death
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 微生物が放出する多様なベシクル
3. 学会等名 高分子と水・分離に関する研究会および2019年度界面動電現象研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 MV形成機構におけるパラダイムシフトとその応用
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 細菌のメンブレンベシクル形成機構と機能
3. 学会等名 第10回 愛媛微生物学ネットワーク（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 ベシクルを介した細菌の化学コミュニケーション
3. 学会等名 第14回化学生態研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masanori Toyofuku
2. 発表標題 How do bacteria “really” communicate
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019,（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Toyofuku M, Tashiro Y, Nomura N, Eberl L	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 18
3. 書名 Bacterial Membrane Vesicles	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 対象物質が封入された膜小胞の製造方法	発明者 豊福雅典、野村暢彦、臼倉雄紀	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-188606	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究室HP
<https://sites.google.com/alumni.tsukuba.ac.jp/masatoyofuku/home>
研究者総覧
<https://trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000003299>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------