

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15726

研究課題名(和文) グルタミン酸生産菌における膜小胞産生メカニズムの解明と応用基盤の創出

研究課題名(英文) Investigation of membrane vesicle formation mechanisms in *Corynebacterium glutamicum*

研究代表者

永久保 利紀 (Nagakubo, Toshiki)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20826961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Corynebacterium glutamicumにおける膜小胞の産生メカニズムを解明し、細胞外物質輸送における本菌の膜小胞の機能に関する知見を得ることができた。C. glutamicumが多様な組成の膜小胞を異なる経路から作り分けることを明らかにした。さらに、外膜成分からなる膜小胞については、細胞外において鉄イオンを捕捉するキャリアーとして機能しうることも発見した。上記の研究成果により、外膜由来膜小胞が鉄欠乏条件下での本菌の生育を向上しうることが明らかになっただけでなく、栄養条件に深く関連する本菌の代謝経路を膜小胞で制御する新たな技術への可能性も拓かれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題を通じて得られた成果は、微生物が産生する膜小胞の形成メカニズムおよび生物学的機能に関する重要な知見を提供した。Corynebacterium glutamicumは、病原細菌である結核菌などを含むミコール酸含有細菌群に属しており、この菌群が産生する膜小胞の機能に注目が集まっている一方で、これまでその産生メカニズムは明らかになっていなかった。また、本研究成果ではCorynebacterium glutamicumが膜小胞を介して細胞外の鉄を獲得する可能性も示唆されており、これは産業上重要な本菌の生育や代謝を制御する上での新たなアプローチにつながる知見となりうる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, novel insights into the mechanisms of membrane vesicle (MV) formation in *Corynebacterium glutamicum* and the biological function of the C. glutamicum MVs were obtained. It was shown that C. glutamicum forms and releases various MVs through different routes. Further, we also found that the MVs derived from outer mycomembrane can load ferric iron and the iron ion loaded with MVs can be received by the cells. From these results, a role of C. glutamicum MVs in acquisition of external iron is suggested. Additionally, this may lead to a MV-based approach to control metabolic pathways of C. glutamicum which depends on the availability of external iron.

研究分野：応用微生物学

キーワード：膜小胞 コリネ型細菌 鉄

1. 研究開始当初の背景

本研究課題を開始した時点では、細菌における膜小胞の産生メカニズムには未解明の問題が多く残されていた。特に、本研究課題で着目する *Corynebacterium glutamicum* が属するミコール酸含有細菌は、複雑な細胞表層構造を有することから、膜小胞産生メカニズムに関する理解が特に遅れていた。一方で、本菌群には結核菌などの臨床上重要な細菌が多く含まれており、それらの病原細菌が産生する膜小胞に免疫刺激活性などが見出されていたことから、膜小胞の組成や機能を左右しうる産生メカニズムの解明には大きな関心が寄せられていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、*Corynebacterium glutamicum* における膜小胞産生メカニズムの解明および本菌の膜小胞を物質生産に応用するための基盤構築を目的とした。具体的には、膜小胞の由来(細胞外膜あるいは内膜)と膜小胞を産生する細胞の生死、および膜小胞が *C. glutamicum* の生育に与える影響の解明を目指した。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、本研究課題では生化学・分子生物学・イメージングを統合した包括的アプローチを用いることとした。具体的には、細菌細胞および膜小胞の構成成分の網羅的な解析、膜小胞の産生に関与すると推定される遺伝子の破壊などによる機能解析、膜小胞を産生する過程を視覚的に捉えるライブセルイメージングの3つの実験を通じて膜小胞の産生メカニズムに迫った。また、膜小胞の生物学的機能を解明するために、96 ウェルプレートを用いて膜小胞が生産菌の生育に与える生理学的な影響を詳細に調べた。さらに、膜小胞の内容物の細胞への伝達を物理化学的および免疫学的な検出法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) *C. glutamicum* における膜小胞産生メカニズムの解明

C. glutamicum における膜小胞産生メカニズムを解明するために、本研究課題では本菌のグルタミン酸生産を誘導する培養条件(ピオチン欠乏、DNA ストレス、ペニシリン添加)に着目した。ピオチン欠乏とペニシリン添加に関しては、本菌の細胞膜の張力に影響を与えることでグルタミン酸の細胞外への排出を促進することが示唆されていた。また、DNA ストレスに関しては、本菌のプロファージ領域にコードされる細胞壁分解酵素の発現を誘導することが示唆されていた。そこで、これらの培養条件が細胞表層構造の変化を介して膜小胞形成を誘導すると仮定し、それぞれの条件における *C. glutamicum* の膜小胞産生量を定量したところ、いずれの培養条件においても膜小胞産生量の増加が認められた。続いて、それぞれの培養条件において産生された膜小胞の組成を詳細に分析した。膜小胞を構成する脂質、タンパク質、DNA、細胞壁成分に対する網羅的な解析の結果、ピオチン欠乏とペニシリン添加によって誘導された膜小胞は外膜由来、DNA ストレスによって誘導された膜小胞は主に内膜由来のものであることが示唆された。さらに、遺伝子破壊と遺伝子相補実験を通じて、プロファージ領域にコードされる細胞壁分解酵素が DNA ストレス条件における膜小胞産生量の増加に寄与していることが示された。続いて、それぞれの条件における膜小胞産生メカニズムに関するさらなる知見を得るために、ライブセルイメージングを行った。その結果、ピオチン欠乏条件においては増殖可能な生細胞が膜小胞を放出していることが明らかになった。また、ペニシリン添加条件においては、本菌の細胞極における細胞壁合成が阻害されて増殖が停止しており、その阻害箇所から膜小胞が盛んに放出されている様子が観察された。さらに、DNA ストレス条件においては、増殖を停止し、かつ細胞表層の透過性が著しく上昇した死細胞から膜小胞が放出される様子がみられた。以上の実験結果から、*C. glutamicum* には異なる3つの膜小胞産生経路が存在することが示唆された。すなわち、

増殖可能な生細胞の外膜に由来する膜小胞、増殖を停止した細胞の細胞極の外膜に由来する膜小胞、プロファージ由来の細胞壁分解酵素による細胞壁が分解された死細胞の内膜に由来する膜小胞の放出である(図1)。上記との経路はグラム陰性細菌における代表的な膜小胞産生メカニ

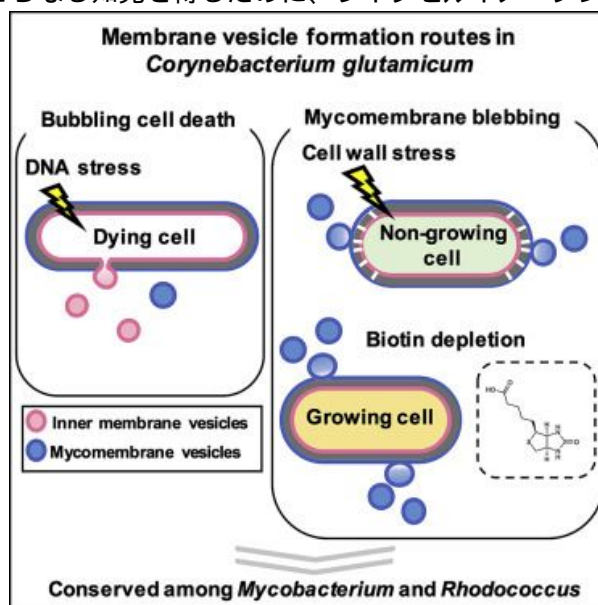


図1 膜小胞産生経路 (Nagakubo et al. iScience (2021))

ズムである outer membrane blebbing に相当すると考えられた。一方で、この経路は非ミコール酸含有細菌のグラム陽性細菌において膜小胞産生経路として近年提唱されている bubbling cell death に相当するメカニズムであると推測された。したがって、*C. glutamicum* は単一生物種でありながらグラム陰性細菌とグラム陽性細菌において別々に見出されてきた膜小胞産生経路を有しているという興味深い知見が得られた。さらに、*Mycobacterium* 属および *Rhodococcus* 属のミコール酸含有細菌においても、上記3つの培養条件における膜小胞産生量の増加が見られたことから、我々が *C. glutamicum* において見出した膜小胞産生経路が近縁種にも保存されている可能性が示唆された。

(2) *C. glutamicum* が産生する膜小胞の生物学的機能の解明

上述の膜小胞産生経路に加えて、*C. glutamicum* は通常の培養条件でも微量ながら膜小胞を放出することが分かっていた。この非ストレス条件における膜小胞の生物学的機能を解明することで、本菌が放出する膜小胞の生態学的な意義を理解するとともに、産業微生物としての本菌の制御に資する知見を得ることを目指した。多くのモデル細菌の膜小胞が細胞外の鉄の取り込みを促進する鉄輸送担体としての機能を有するという知見に基づいて、*C. glutamicum* においても膜小胞が鉄の輸送に関わるという仮説を立てた。そこで、非ストレス条件で産生された本菌の膜小胞を鉄と混合して鉄含量を定量したところ、この膜小胞が鉄と結合しうることが強く示唆された。また、タンパク質分解酵素で表層タンパク質の除去が膜小胞と鉄の結合にほとんど影響を与えなかったことから、本菌の膜小胞と鉄の相互作用は膜小胞関連タンパク質に依存しないことが示唆された。次に、鉄を含む膜小胞を鉄欠乏培地に添加して *C. glutamicum* を培養したところ、鉄欠乏により低下した本菌の生育が著しく向上することが分かった(図2)。この結果は、膜小胞に結合した鉄が細胞に運ばれて利用されたことを示唆する。この鉄輸送過程に関する知見を得るために、電子線イオンアナライザーを用いて膜小胞を受け取った細胞を分析したところ、膜小胞から細胞内に鉄が輸送されたことを示す結果が得られた。さらに、膜小胞に多く含まれる膜貫通タンパク質(HtaB)に対する抗体を用いたウェスタンブロット解析により、*C. glutamicum* の細胞に膜小胞が安定して付着しうることが明らかになった。以上の結果は、*C. glutamicum* の膜小胞が細胞への付着を介して細胞内に鉄を伝達しうることを示している。さらに、*C. glutamicum* の膜小胞を用いて同様の解析を他のミコール酸含有細菌(*Mycobacterium* 属および *Rhodococcus* 属)および非ミコール酸含有細菌(*Bacillus subtilis*)に対して行った。その結果、*C. glutamicum* の膜小胞が上記全ての供試菌の細胞に対して付着しうる一方で、膜小胞から細胞への鉄の伝達が起こるのは近縁のミコール酸含有細菌に限られることが示唆された。これらの研究成果は、*C. glutamicum* が放出する膜小胞が生産菌やその近縁種に対して鉄を伝達する生物学的機能を有することを示すと同時に、膜小胞を介した物質伝達により *C. glutamicum* の生育および代謝を制御する新たな生物工学的な方法論の確立につながる知見を提供した。

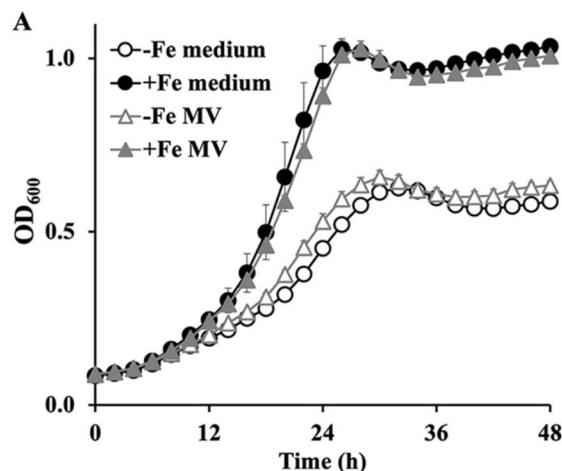


図2 膜小胞を介した鉄の伝達

プロットはそれぞれ以下の培養条件における *C. glutamicum* の生育を示す。

白丸: 鉄欠乏培地、黒丸: 鉄十分培地、白三角: 無処理膜小胞+鉄欠乏培地、灰色三角: 鉄結合膜小胞+鉄欠乏培地

(Kawashima *et al. Microbiology Spectrum* (2023))

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toshiki Nagakubo, Yuhei O Tahara, Makoto Miyata, Nobuhiko Nomura, Masanori Toyofuku	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 2021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 Kayuki Kawashima, Toshiki Nagakubo, Nobuhiko Nomura, Masanori Toyofuku	4. 巻 -
2. 論文標題 Iron delivery through membrane vesicles in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0122223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.01222-23	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 川島花雪、永久保利紀、野村暢彦、豊福雅典
2. 発表標題 <i>Corynebacterium glutamicum</i> の膜小胞を介した鉄獲得の解析
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島花雪、永久保利紀、野村暢彦、豊福雅典
2. 発表標題 <i>Corynebacterium glutamicum</i> が産生する膜小胞の機能解析
3. 学会等名 2021年度グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島花雪、永久保利紀、野村暢彦、豊福雅典
2. 発表標題 Corynebacterium glutamicumにおける膜小胞を介した鉄輸送の解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会沖縄大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kayuki Kawashima, Toshiki Nagakubo, Nobuhiko Nomura, Masanori Toyofuku
2. 発表標題 Membrane vesicles-mediated iron acquisition in Corynebacterium glutamicum.
3. 学会等名 EMBO Workshop 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島花雪、永久保利紀、野村暢彦、豊福雅典
2. 発表標題 コリネ型細菌が放出する膜小胞を介した鉄輸送の解析
3. 学会等名 2022年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kayuki Kawashima, Toshiki Nagakubo, Nobuhiko Nomura, Masanori Toyofuku
2. 発表標題 Corynebacterium glutamicum recruit membrane vesicles for iron acquisition.
3. 学会等名 12th Asian Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物が多様な膜小胞を作る仕組みを解明
<https://www.tsukuba.ac.jp/journal/biology-environment/20210115010000.html>
微生物が多様な膜小胞を作る仕組みを解明
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20210115/index.html>

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
---------	---------