

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22411

研究課題名(和文) 内在性ファージが司る細菌の細胞分化

研究課題名(英文) Bacterial cell differentiation controlled by prophages

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムにプロファージを保持している細菌では、集団全体の1%程度の割合で細胞壁を失った細菌が出現することを我々は見出した。細菌は細胞壁を失うと、通常の細菌とは大きく異なる性質を発揮することが考えられるが、これまでに検証されてこなかった。本申請課題では、細胞壁を失った細菌の基礎的性状を明らかにすることを目的とした。細胞壁を失った細菌の出現頻度は低いため、培養条件の最適化を行い、全体の90%近くの細胞が細胞壁を失って生存する培養系を構築した。このような細胞はグラム陰性菌とグラム陽性菌の両者で出現することも明らかにし、解析の結果、一種の休眠状態になっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞壁を失った細胞は通常の細胞とその性質が大きく異なることが予測されるが、そのような細胞が自然界に存在し、何らかの役割を果たしているとはこれまでにほとんど考えられてこなかった。本成果によって細胞壁を失った細胞がグラム陰性菌および陽性菌のモデル細菌で出現することが明らかとなり、多くの細菌が環境に応じて一種の形態分化を行うことが示唆された点で学術的な意義がある。さらに、細菌を失った細菌はある種の抗生物質への耐性も示しており、微生物制御新たな観点もたらす。

研究成果の概要(英文)：We have found that in bacteria that harbor prophage in their genome, cell that lose their cell walls appear in about 1% of the entire population. Bacteria that have lost their cell walls may exhibit properties that are different from those of normal bacteria. Therefore, we aimed to characterize the basic properties of bacteria that have lost their cell walls. Although bacteria that have lost their cell walls occur infrequently, in this study, we optimized the culture conditions and established a culture system in which nearly 90% of all cells survive without cell walls. We also found that such cells appeared in both Gram-negative and Gram-positive bacteria. The analysis also suggested that the bacteria are in a kind dormant state.

研究分野：微生物学

キーワード：プロファージ 細菌 形態分化 細胞壁

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌は細胞壁を失うと、通常の細菌とは異なる性質を有するために、これまで分子生物学の実験ツールとして用いられてきた。しかしながら、こうした細胞が自然界に存在するかどうかについては、ほとんど研究されておらずその役割も不明である。その一方で、ファージをゲノム上に保持している細菌では、集団全体の1%以下の割合で「細胞壁を失った細菌」(以下、Rcell)が出現することを私たちは見出した。Rcellは、メンブレンベシクルの形成において重要な役割を担っていることが分かっているが、そのほかの生物学的な意義については不明である。また、Rcellは多くの細菌で形成される可能性があるが、これまで見過ごされており、その存在すらほとんど知られていない。

2. 研究の目的

本申請課題では、その普遍性が示唆されながらも実態が明らかになっていないRcellの基礎的な特性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株を及び培養条件

グラム陰性菌のモデル最近として、主に *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 を用いた、また、グラム陽性菌のモデル細菌として、枯草菌を用いた。Rcell は、ホリン-エンドリシンをコードする遺伝子を誘導プロモーター下に繋げて発現を誘導することで、形成を促進させた。形成させた Rcell が溶菌せずに残る条件を検討した。

(2) Rcell の形態解析

Rcell の性質を解析するために、蛍光試薬を用いて呼吸活性や膜透過性、ペプチドグリカンの存在を観察した。また、超薄切片を作製して、その微細構造を TEM によって観察した。また SEM 観察により、細胞の形状を観察した。

(3) 抗生物質感受性

流体デバイスを用いて、細胞を固体したまま、ライブセルイメージングを行った。抗生物質として、ナイシンとメロペネムを用いた。

4. 研究成果

(1) R-cell の誘導条件検討

通常の培養条件下では、Rcell が出現する割合が、全体の 1%以下であり解析が極めて困難となる。そこで、Rcell 形成を促進できるように、ホリンおよびエンドリシンの発現を誘導できる株を作製した。誘導株において Rcell 形成が促進されることが確認された。さらに、培養条件を最適化した結果、細胞全体の 90%以上を Rcell 化させることに成功した。Rcell 形成は緑膿菌および枯草菌で確認された。

(2) Rcell の形態解析

調製した緑膿菌 Rcell の超薄切片を作製して TEM 観察を行った結果、外膜を完全に失ってはならず、部分的に欠失している様子が観察された。また、内膜に関しては大きな欠失は認められなかった。Fluorescent D-amino acid (FDAAs)である BADA を使用したところ、Rcell にはペプチドグリカン層が残っていることが示された。コントロールとして、調製したプロトプラストには、BADA によりペプチドグリカンは検出されなかった。Live/dead 染色によって細胞の膜透過性を検証した結果、ほとんどの Rcell は PI で染色されなかった。TEM 観察の結果と合わせると、外膜は部分的に欠失しているものの、内膜は完全なままであることが示された。その一方で、一部の Rcell のみ呼吸活性を有しており、Rcell は形状が似ていても、生理状態が異なることが示唆された。SEM 観察の結果、細胞の表面にメンブレンベシクルと思われる構造も観察され、定量的な解析からも MV を通常の細胞よりもよく付着することが示唆された。ライブセルイメージングを行うなかで、Rcell が最増殖する様子も観察されており、今後はその最増殖の条件を明らかにする必要がある。

(3) 抗生物質感受性

Rcell の外膜が一部欠失している結果を受けて、外膜を有する最近には殺菌効果を示さないナイシンを用いて、緑膿菌 Rcell の抗生物質感受性を調べた。その結果、外膜を人工的に除いたプロトプラストはナイシン添加後 300 min 程度でほぼ全ての細胞が溶菌する様子が見られたが、Rcell、ナイシン添加後 400 min 時点でも生存が確認された。次に、細胞壁合成阻害である β -lactam 系の抗生物質、メロペネムを用いたところ、通常の桿菌はメロペネム存在下では、緑膿菌 Rcell が球状になり 6 時間程度で溶菌する様子がみられた。一方で Rcell は、8 時間時点でも多くが形態を維持している様子が見られた。このことから Rcell は細胞壁合成阻害の抗生物質であるメロペネム感受性が低いことが示唆されました。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4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 Nagakubo Toshiki, Tahara Yuhei O., Miyata Makoto, Nomura Nobuhiko, Toyofuku Masanori	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 ~ 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 Morinaga Kana, Nagakubo Toshiki, Nomura Nobuhiko, Toyofuku Masanori	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of membrane vesicles in long chain AHL delivery in Paracoccus species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology Reports	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 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 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 Abe Kimihiro, Toyofuku Masanori, Nomura Nobuhiko, Obana Nozomu	4. 巻 23
2. 論文標題 Autolysis mediated membrane vesicle formation in Bacillus subtilis	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 無
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 無
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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

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 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 兼松周作、野村暢彦、豊福雅典
2. 発表標題 緑膿菌細胞集団中に出現するスフェロプラスト様細胞の解析
3. 学会等名 生化学若い研究者の会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊福雅典
2. 発表標題 細菌の生き様を捉える
3. 学会等名 生化学若い研究者の会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田 潤、兼松周作、野村暢彦、豊福雅典
2. 発表標題 球状になる緑膿菌の亜集団細胞の解析
3. 学会等名 第56回緑膿菌感染症研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田 潤、兼松周作、野村暢彦、豊福雅典
2. 発表標題 緑膿菌細胞集団中の一部で出現する球状細胞の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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