

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23665

研究課題名（和文）窒素固定細菌のエクソソーム様膜小胞の機能と形成機構の解明

研究課題名（英文）Function and formation of exosome-like membrane vesicles of nitrogen-fixing bacterium

研究代表者

高瀬 隆一（Takase, Ryuichi）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10842156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、グラム陰性細菌の細胞外膜より形成・分泌される膜小胞（outer membrane vesicle, OMV）に着目し、OMVの形成に関する候補タンパク質を見出した。

窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* のOMVに多量に内包されるタンパク質として、S-layerタンパク質様機能不明分子と鞭毛繊維タンパク質FliCホモログを特定し、当該遺伝子破壊株の性状解析より各々細胞膜の形成とOMVの産生に関わることを示唆した。OMV内包タンパク質のプロテオーム解析により、640種のタンパク質を同定し、OMVへのタンパク質輸送機構やOMVの生理活性を予測する手がかりを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌が自身の細胞膜から形成・分泌する膜小胞は細胞間コミュニケーションなど様々な生理活性を示すことが明らかになってきた一方、その普遍的な形成機構は不明であった。本研究では窒素固定グラム陰性細菌 *Azotobacter vinelandii* に着目し、膜小胞に内包されるタンパク質の網羅的解析を行うとともに、膜小胞の形成に関わる候補タンパク質を見出した。本研究成果は、膜小胞の普遍的な形成機構の一端を明らかにすることのみならず、OMVのサイズや性質を制御する分子機構の理解、及び窒素固定細菌OMVの新たな機能の発見に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study deals with outer membrane vesicles (OMVs) which are formed and secreted from the extracellular membrane of Gram-negative bacteria. Based on the characteristics of gene knockout strains of *Azotobacter vinelandii*, function-unknown S-layer protein and a flagellar fiber protein FliC homolog were found to be involved in membrane formation and OMV production, respectively. Proteomic analysis of the OMV identified 640 proteins, providing clues to predict the mechanism of protein transport to OMV and the bioactivities of OMV.

研究分野：農芸化学および応用微生物学

キーワード：膜小胞 窒素固定細菌 プロテオーム解析 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

近年、細菌の細胞膜の一部から形成・分泌される膜小胞が細胞間コミュニケーションなど様々な生理学的意義を有することが解明されてきたが¹、普遍的な膜小胞形成機構の全容解明には至っていない。当研究室ではグラム陰性窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* がアルギン酸を内包した細胞外膜由来の膜小胞 (outer membrane vesicle, OMV) を細胞外にまとい、防御形態 (シスト) 化を引き起こすことを明らかにしている (図 1)²。*A. vinelandii* は固定窒素や植物ホルモンの分泌により植物の成長を促進することが知られているが、本菌の膜小胞が植物に与える影響は不明である。

2. 研究の目的

本研究では窒素固定グラム陰性細菌 *A. vinelandii* の OMV に着目し、OMV の形成機構の解明、並びに OMV の新たな機能とその因子を明らかにすることを目的とした。OMV の形成にはタンパク質による能動的な細胞膜の湾曲や切断が関与していると仮定し、新たなタンパク質とその機能について明らかにする。実際、グラム陰性細菌の OMV 形成について、エネルギー消費の観点から OMV 形成を考えると、細胞サイズの単

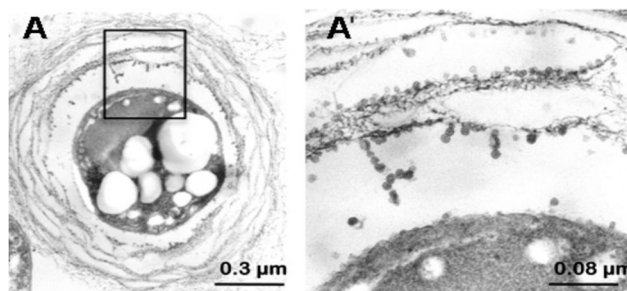


図 1. *A. vinelandii* 由来 OMV によるシスト形成

A, 細胞とシスト莢膜; A', A の拡大図。黒粒は OMV。

純な脂質二重層から膜小胞を一つ形成するために、25 個分の ATP 加水分解エネルギーが必要であることが示されている³。しかし、これまでに提唱された OMV 形成モデルは、いずれもエネルギー消費が考慮されていないため、未解明の膜小胞形成機構の存在が示唆される。

OMV の機能について、窒素固定細菌が生理活性物質を植物に輸送する際に OMV を利用する可能性を考慮し、OMV のプロテオーム解析や実際に植物を用いたアッセイを行い、評価する。

3. 研究の方法

(1) 微生物と培地

本研究では窒素固定細菌 *A. vinelandii* を用い、培養には窒素制限スクロース-MB (S-MB) 培地 (20 mg/ml sucrose, 0.2 mg/ml NaCl, 0.05 mg/ml CaSO₄·2H₂O, 0.2 mg/ml MgSO₄·7H₂O, 0.29 μg/ml Na₂MoO₄·2H₂O, 27 μg/ml FeSO₄·7H₂O, 0.66 mg/ml K₂HPO₄, 0.16 mg/ml KH₂PO₄) を用いた。

(2) 遺伝子破壊

A. vinelandii の遺伝子を破壊するためのプラスミドを大腸菌細胞を用いて構築した。目的遺伝子をプラスミド pUC119 にクローニング後、遺伝子中央に pACYC184 由来テトラサイクリン耐性遺伝子を挿入した。その後、目的遺伝子断片を PCR により増幅し、精製・濃縮した後に *A. vinelandii* と混合・培養することで自然形質転換を行った。得られた遺伝子破壊株はテトラサイクリン含有培地で選抜後、DNA シーケンスに供することで遺伝子の破壊を確認した。

(3) 顕微鏡観察

細胞表面の形状を観察するため、野生株並びに各遺伝子破壊株をパラホルムアルデヒドと酸化オスミウムで固定後、エタノールと *t*-ブチルアルコールで脱水処理を行い、乾燥後に白金パラジウムでコーティングし、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察に供した。また、培養上清に含まれる膜小胞を観察するため、*A. vinelandii* の培養上清を 0.22 μm フィルターで処理し、脂質蛍光試薬 Nile Red で染色し、蛍光顕微鏡観察により評価した。実体顕微鏡を用いて遺伝子破壊株の観察も行った。

(4) X 線結晶構造解析

S-layer タンパク質の組換え発現系を、大腸菌細胞を用いて構築し、大量発現後に 4 種類のラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた精製タンパク質を結晶化し、SPRing-8 (兵庫) にて X 線結晶構造解析を行った。AlphaFold2⁴ で構築したモデルを用いた分子置換法により、N 末端ドメイン (1-310 残基) の立体構造を得た。

(5) プロテオーム解析

A. vinelandii の培養上清から ExoBacteria OMV Isolation Kit (システムバイオサイエンス) を用いて精製した OMV をプロテオーム解析 (Promega 社) に供し、タンパク質を同定した。

(6) イネの伸長アッセイ

A. vinelandii がイネの生育に及ぼす影響を明らかにするため、玄米 (ホクレン北海道産玄米 ゆめぴりか) をスクロースを除いた S-MB 培地に浸し、発芽・生育させる際、*A. vinelandii* を培地に添加した。生育は 30°C のインキュベーター内で行い、成長は重さ並びにイネの高さにより評価した。

4. 研究成果

研究の主な成果

(1) OMV に内包されたタンパク質遺伝子破壊株の細胞膜及び OMV への影響

OMV の形成や機能には OMV に内包されるタンパク質が関わる可能性が高いと考えられる。これまで、*A. vinelandii* 由来 OMV を精製し、SDS-PAGE に供することで OMV 内に特に多く含まれるタンパク質二種類(S-layer タンパク質とべん毛繊維タンパク質 Flagellin (FliC) ホモログタンパク質)を同定した。S-layer タンパク質は機能不明であり、ゲノム中の当該遺伝子近傍には 10 種のリポ多糖合成や 8 種のタンパク質分泌に関わる遺伝子が位置していた。これら遺伝子は OMV 形成に関与する可能性がある。それら遺伝子群の間に、S-layer タンパク質を含む 8 種の機能未知タンパク質遺伝子が存在した。一般的に細菌では協調して機能するタンパク質群はクラスターを形成する傾向が認められるため、これら機能未知タンパク質遺伝子群は周囲のタンパク質と連携して OMV の形成に関与することが示唆された。FliC ホモログタンパク質について、大腸菌の FliC 遺伝子破壊株は OMV 形成能が低下するという報告は既にあるが⁵、FliC がどのようなメカニズムで膜形成に関与するかについては未解明である。これら遺伝子の機能を明らかにするため、各遺伝子破壊株を育種し、その細胞膜への影響を SEM や細胞膜を蛍光標識した後に蛍光顕微鏡で観察することで評価した。

その結果、S-layer タンパク質遺伝子破壊株は細胞膜表面が融合した形状を示し、FliC ホモログタンパク質遺伝子破壊株は OMV 形成能が向上していた(図 2)。従って、これらタンパク質は各々細胞膜の形状、または OMV 形成量の制御に関わる可能性が示唆された。

各遺伝子破壊株を培養し、培養上清を超遠心分離に供し、OMV を精製した。精製 OMV に含まれるタンパク質量の定量により、OMV の生産量を評価した。その結果、S-layer タンパク質と FliC ホモログタンパク質両遺伝子破壊株の生産量は、野生株と比較していずれも OMV の生産量が 1% 以下となり、顕著に減少していた(S-layer タンパク質 : 0.80%、FliC ホモログタンパク質 : 0.79%)。FliC ホモログタンパク質遺伝子破壊株の OMV 生産量について、蛍光顕微鏡観察の結果との不一致について、FliC ホモログタンパク質遺伝子を破壊することで OMV の大きさや密度などの性質が変化したために野生株の OMV と同様の超遠心条件では OMV が効率的に回収できなかった可能性が考えられる。顕微鏡の結果と合わせて考えると、これら両遺伝子は膜小胞の形成に影響を及ぼすことが示された。

(2) S-layer タンパク質の局在解析

上記遺伝子が OMV の生産に関わる機構について明らかにするため、S-layer タンパク質の局在をリアルタイムで観察することを目的として、S-layer タンパク質の C 末端に蛍光タンパク質遺伝子を融合したプラスミドを作製した。OMV はペリプラズム空間内のタンパク質を用いて形成される可能性が高いと考えられるため、蛍光タンパク質はペリプラズムにおいても蛍光を示す mcherry を用いた。現在、当該プラスミドを用いて *A. vinelandii* の形質転換を進めており、蛍光顕微鏡を用いた S-layer タンパク質のリアルタイム局在解析を通じて、OMV 形成への関わりを明らかにする予定である。

(3) S-layer タンパク質の X 線結晶構造解析

S-layer タンパク質は機能不明に関わらず多くが OMV に内包されていたことから、新たな機構で OMV 形成に関わる可能性があるため、その機能を立体構造から推定することを目的とし、X 線結晶構造解析を行った。SPRing-8 で良好な X 線回折データ(完全性 99%) を取得した。一次構造上類似性を示すタンパク質のうち、立体構造が既知のモデルが存在しないため、その立体構

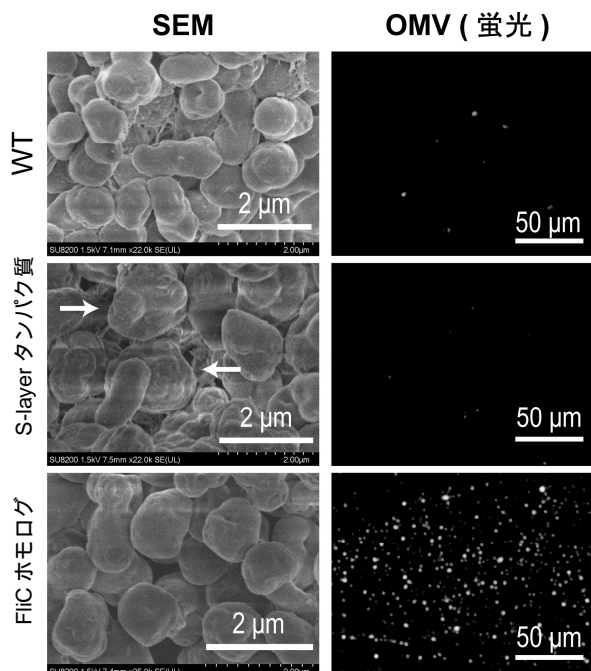


図 2. *A. vinelandii* 野生株と遺伝子破壊株の細胞表面(左)及び OMV 生産能(右)

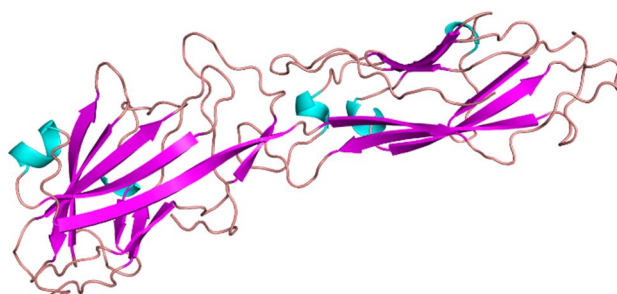


図 3. S-layer タンパク質の N 末端ドメイン(1-310 残基)

造モデルをタンパク質の構造計算ツール AlphaFold2⁴ を用いて構築し、分子置換を行った。その結果、得られた立体構造の N 末端領域 2/3 (1-310 残基) は電子密度マップと一致していたが (図 3) その他の領域 (311-434 残基) は一致しておらず、最終的な立体構造の決定には至らなかった。立体構造上、N 末端領域と C 末端領域は異なるドメインを形成していると考えられる。完全な S-layer タンパク質の立体構造を取得し、その機能を推定するため、セレノメチオニン置換タンパク質を用いた多波長異常散乱法による構造解析を進めている。

(4) OMV 遺伝子クラスター内遺伝子の破壊株の観察

OMV 形成に関わると予想される S-layer タンパク質近傍機能未知遺伝子 7 種類について、各遺伝子破壊株を育種した。それら遺伝子破壊株を SEM 観察に供した結果、細胞膜の形状はいずれも野生株と類似していた。今後、各破壊株の OMV 生産量を定量評価するとともに、複数のタンパク質が補助的に作用して OMV 形成に関与する可能性も考えられるため、上記遺伝子の多重遺伝子破壊株を育種し、同様に解析を進める。

(5) エネルギー消費型 OMV 形成 GTPase 破壊株は細胞長が伸長した

OMV の形成にはエネルギー消費を伴う細胞膜の変形や切除が必要であると予測し、実際に細胞膜の変形に関与することが多い GTPase に着目した。A. vinelandii のゲノム中に含まれる機能未知タンパク質を含む 3 種類の GTP 加水分解酵素の遺伝子破壊株を育種した。実体顕微鏡で観察した結果、興味深いことにいずれの 3 株も一部の細胞の長さが野生型と比較して長くなっていた。その中でも、特に細胞質局在性を示すタンパク質翻訳に関与する BipA ホモログタンパク質の遺伝子破壊株は細胞長が 5 倍以上長くなっていた。従って、上記遺伝子は正常な細胞膜の合成・切断に関与していることが示された。BipA ホモログタンパク質は、OMV にも内包されるタンパク質としても同定された。従って、BipA ホモログタンパク質は細胞における細胞膜の合成・切断のみならず、OMV の形成にも関与する可能性があることが示唆された。

(6) OMV のプロテオーム解析

OMV の機能について、プロテオーム解析により内包タンパク質を網羅的に同定し、それらタンパク質の機能を考慮することで、OMV の機能について明らかにすることを試みた。精製 OMV をプロテオーム解析に供し、様々な機能を有する内包タンパク質 640 種を同定した (図 4)。タンパク質の機能の内訳として、代謝 (36%)、転写・翻訳 (10%)、ストレス応答・恒常性維持 (10%)、膜輸送 (9%)、細胞膜合成・分解 (7%)、アルギン酸合成・分解 (3%)、リポタンパク質 (2%)、細胞外膜局在タンパク質 (1%)、機能不明 (15%)、その他 (7%) となった。

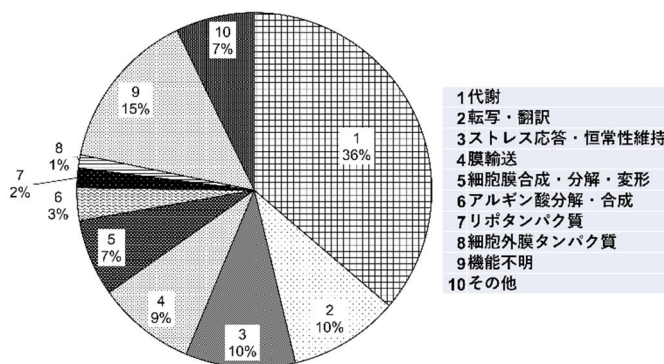


図 4. OMV 内包タンパク質の内訳

各タンパク質の局在性については、A. vinelandii のもつ全 4,991 タンパク質の局在と比較して、細胞質膜局在タンパク質の割合が少ないのに対し (全タンパク質: 19%、OMV 内: 8%)、割合が高いタンパク質として細胞質 (全タンパク質: 44%、OMV 内: 55%)、細胞外膜 (全タンパク質: 3%、OMV 内: 8%)、ペリプラズム (全タンパク質: 2%、OMV 内: 7%)、並びに細胞外 (全タンパク質: 1%、OMV 内: 4%) 局在性のタンパク質が認められた。OMV において高い割合を示したタンパク質の局在は細胞質を除き、いずれも膜小胞に関与すると考えられる空間と一致することから、OMV はグラム陰性細菌の細胞外膜が突出して形成されるモデルを支持する結果であると考えられる。ただし、細胞質局在性を示すタンパク質が OMV に多く含まれた結果については予想外であった。この結果から、細胞質からペリプラズム空間をまたいで OMV にタンパク質を輸送する機構が存在することが一部示唆された。

(7) A. vinelandii がイネの生育に及ぼす影響

実際に A. vinelandii の生産する OMV が植物の生育に与える影響を明らかにするため、玄米を発芽する際に、A. vinelandii を添加し、その影響を観察した。培地には A. vinelandii の産生する固定窒素の影響を観察するため、窒素源を制限した最少培地を用いた。その結果、A. vinelandii の添加の有無に関わらず、玄米の生育には影響が認められなかった。一部菌を添加した培地において玄米が枯れた様子も認められたため、実際の土壌中とは異なり、A. vinelandii の生菌数が多すぎたため、土壌中とは異なる影響を及ぼし、イネの生育を阻害した可能性も考えられる。今後はイネの生育に与える A. vinelandii の影響を適切に評価可能な培養条件を決定する必要がある。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究は窒素固定細菌の OMV に着目し、OMV の形成や細胞膜の形成に関わるタンパク質を見出した点において OMV の形成機構の解明の一端に貢献することが期待される成果である。また、植物の成長を促進することが知られている *A. vinelandii* の膜小胞に含まれるタンパク質を初めて網羅的に解析し、OMV のもつ生理活性について推定が可能となったため、OMV の有効利用へと繋がる知見が得られた。

今後の展望

今後、膜小胞の普遍的な形成機構の解明を目指し、OMV 形成に関与すると期待されるタンパク質の機能解明を進める。当該タンパク質群の発現量ならびに活性を変化させることで OMV の分泌量やサイズ等の性質を制御することが可能となることが期待される。得られる成果は、窒素固定細菌由来 OMV を用いた農産物の収量増加等に応用可能となることが期待される。

< 引用文献 >

¹ Pegtel *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, 2019

² Hashimoto *et al.*, *Int. Microbiol.*, 2013

³ 細胞の物理生物学初版第 11 章、生体膜、510 頁

⁴ Jumper *et al.*, *Nature*, 2021

⁵ Manabe *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高瀬隆一、吉田暢広、橋本 渉
2. 発表標題 窒素固定細菌の細胞外膜由来膜小胞に関するプロテオーム解析
3. 学会等名 第67回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸田 有希渚、高瀬 隆一、渡辺 大輔、野村 暢彦、橋本 渉
2. 発表標題 動物宿主由来多糖を資化する腸内優占菌の膜小胞形成
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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