

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658068

研究課題名（和文） 細胞外小胞は、異種細菌間情報伝達のシグナル運搬役となりうるか？

研究課題名（英文） Are bacterial outer membrane vesicles carriers for bacterial signals among different species

研究代表者

野村 暢彦 (NOMURA NOBUHIKO)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60292520

研究成果の概要（和文）：近年の微生物研究における革新的な発見として、微生物が産生する低分子化合物（シグナル）を介した微生物間情報伝達が急発展している。しかし、細胞間におけるシグナルの動態の理解は重要にもかかわらず、未解明のままである。一方、多くのグラム陰性細菌は細胞外に小胞（ベシクル）を分泌し、その中にシグナルが存在することが明らかになってきた。そこで本研究は、「細胞外小胞（ベシクル）は、異種細菌間情報伝達のシグナル運搬役となりうるか？」を検証する。

研究成果の概要（英文）：Gram-negative bacteria naturally secrete sphere shaped vesicles that are approximately 50 to 250 nm. These vesicles are mainly composed of cellular outer membrane and hence called membrane vesicles (MVs). MVs are related to the pathogenesis of several bacterial pathogens where they function as a cargo for virulence factors against their host. MVs also play important role in the bacterial ecology by functioning in the competition against other cells, or on the other hand, by carrying signaling molecules to support the cooperative behaviors of bacteria. In addition, it is proposed that MVs are involved in cell material transfer among bacterial cells. While MVs have great impact on the bacterial physiology, the biogenesis of MVs is not fully understood. Here, we investigated that bacterial outer membrane vesicles include a role as a carrier of bacterial signals among different species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：微生物

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：メンブランベシクル

1. 研究開始当初の背景

（微生物間コミュニケーション）

パスツールが微生物の存在を証明して以来、分離培養可能な単一微生物種を純粋培養

することが応用微生物学の主となってきた。しかし、自然界の多くの微生物は様々な環境下で、多様な相互関係を維持しながら共存して複合微生物系を形成しており、その多くは

単一微生物では得られない多様な機能を有していることが明らかとなってきた。一方、近年の微生物研究における革新的な発見として、微生物が産生する低分子化合物（シグナル）を介した微生物間情報伝達が急発展している。申請者は、緑膿菌のシグナル Pseudomonas quinolone signal (PQS) が、細菌の呼吸を抑制することで生育速度を遅らせることを発見している(1)。

(微生物が分泌する細胞外小胞メンブランベシクル (以下ベシクルと略す))

一方、ほとんどのグラム陰性細菌は細胞外に小胞 (ベシクル) を分泌することが明らかになってきた。また、興味深いことに、ベシクル中に PQS 等のシグナルが含まれており、さらに、申請者グループは、ベシクルによりシグナルが受容菌 (同種) に伝達されることを世界で初めて報告し、つまり、ベシクルがシグナルの運搬役になることを示した(2)。

しかし、それらは同一微生物間でのみでしか研究がなされておらず、異種間細菌においてベシクルがシグナルの運搬役になるかは全く研究されてなく、非常に興味深かつ意義深い。

これまで細菌間コミュニケーションでは、シグナルのみに着目されて来た。本申請により、ベシクルが運搬役として異種細菌間コミュニケーションにおいて重要な役割を担っていることが示された場合、微生物間コミュニケーション分野において全く新しい知見を与える事となる。それは、感染症をはじめ、廃棄物処理のメタン発酵、水処理の活性汚泥などの様々な分野において、ベシクルが新しい複合微生物系の制御 (対象) 因子として、革新的制御技術開発の糸口となる。

(1) Toyofuku M, Nomura N,* (他 1 人) Influence of the Pseudomonas Quinolone Signal on Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 190(24) 7947-7956 (2008) (M.T. and N.N. contributed equally)

(2) Tashiro Y., (他 6 名) Nomura N*. Variation of physiochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Environmental Microbiology 76(11):3732-9 (2010)

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、「細胞外小胞 (ベシクル) は、異種細菌間情報伝達のシグナル運搬役となりうるか？」を検証する。具体的には、ベシクルがシグナルの運搬役として異

種細菌間コミュニケーションにおいても重要な役割を担っているかを明らかにする。

3. 研究の方法

3-1 ベシクルの調製

研究期間全体でベシクルの調製は野村が行う。緑膿菌から細胞外小胞ベシクルの精製法は構築済みであり、必要に応じてベシクルの調製し供給が可能である。また、PQS 合成遺伝子変異株を用いることで、PQS を含まないベシクルを調製する。

3-2 ベシクルと細胞の接触・融合の解析

ベシクルが細胞へ吸着また融合するかを観察するため、ベシクルを蛍光ラベルし、レーザー共焦点顕微鏡を用いることで、細胞への接触を三次元での可視化を可能にする (手法は構築済み: 図 1)。

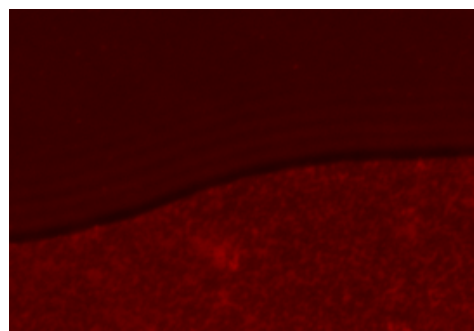


図 1 蛍光標識されたメンブランベシクル

3-3 供試菌株

Pseudomonas aeruginosa, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas denitrificans*, *Clostridium perfringens*

3-4 培養条件

LB 培地を用いて、本培養は初期菌体濃度が OD600=0.01 となるように植菌した。

P. aeruginosa, *P. putida* 等は、37 °C で培養した。それ以外の株については 30 °C で培養を行なった。特に断りがない限り培養は好気条件下で行なったものとする。PQS は 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) にそれぞれ溶解して、20 mM 溶液を調整した。PQS を添加した場合の対照として DMSO を適宜添加した。

4. 研究成果

本研究ではまず、*Pseudomonas aeruginosa* により生産されたメンブランベシクルが異種細菌に融合するのかを調べた。そのため、まず実験系の確立を行った。

Pseudomonas aeruginosa が生産したメンブランベシクルを回収し、それを FITC により蛍光ラベリングした後に 3 回洗浄し、*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas denitrificans* に暴露した。30℃で2時間培養後、細胞を生理食塩水で洗浄し、細胞の蛍光強度を測定した。その結果、メンブランベシクルを暴露したサンプルでは蛍光が検出された。この結果は、本実験系が成功したことを示している。さらに、蛍光ラベルされたメンブランベシクルが供試菌株の各細胞に融合した結果が得られた。しかし、メンブランベシクルに含まれるシグナル分子が、相手側細胞に伝達されたかは、*Pseudomonas aeruginosa* 以外のグラム陽性細菌を含む他の細胞では確認出来なかった。今後、さらに詳細に調べる必要がある。

今後はさらに様々な細菌種で同様の試験を行い、メンブランベシクルの宿主域を検討するとともにその意義について解明していくことに興味を持たれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(査読有り)

1) Obana N, Nomura N, Nakamura K. Structural Requirement in *Clostridium perfringens* Collagenase mRNA 5' Leader Sequence for Translational Induction through Small RNA-mRNA Base Pairing. *Journal of Bacteriology*. 2013 Jun;195(12):2937-46. doi: 10.1128/JB.00148-13. Epub 2013 Apr 12.

2) Wang S, Nomura N, Nakajima T, Uchiyama H. Case study of the relationship between fungi and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113(5):624-30 (2012)

3) Tashiro Y, Uchiyama H, Nomura N*. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 14(6):1349-62 (2012)

4) Toyofuku T, Uchiyama H, and Nomura N*.

Social behaviours under anaerobic conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Microbiology*. 2012: Article ID 405191, (2012).

5) Venkata H N N, Nomura N, Shigeto S, Leucine pools in *Escherichia coli* biofilm discovered by Raman imaging. *Journal of Raman Spectroscopy* 42(11) 1913-15 (2011)

6) Tashiro Y, Inagaki A, Shimizu M, Ichikawa S, Takaya N, Nakajima-Kambe T, Uchiyama H, Nomura N*. Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 75(3):605-7. (2011)

[学会発表] (計 5 件)

(招待講演)

1) 野村暢彦:「細菌生態学からのバイオフィルム研究」、「バイオフィルム研究における最近の潮流」、第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 59 回日本化学療法学会東日本支部総会・合同学会 (ホテル日航東京)、2012 年 10 月 11 日

2) Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N. “Fine Tuning of electron flow by cell to cell communication” The 4th Japan-Korea International Symposium on Microbiology Ecology. Toyohashi, Japan, 9th September, 2012

3) 野村暢彦:「バイオフィルムの基礎研究から臨床への展開へ」、小林 宏行先生メモリアルセミナー「病原微生物のバイオフィルムと疾病の関わり—基礎と臨床展望—」、第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会・合同学会 (ホテルメトロポリタン山形)、2011 年 10 月 27 日

4) 野村暢彦:「微生物集合体バイオフィルム内の細胞外 DNA の役割」、細胞外核酸の動態: 医科学・環境科学での新しい観点からの研究・応用展開、第 84 回日本生化学会大会 (京都国際会館)、2011 年 9 月 24 日

5) 野村暢彦:「マイクロデバイス技術と新規イメージング技術の融合による新しい微生物解析技術の開発 - 微生物のありのままの非破壊・非侵襲的かつ経時的な解析」、「ゲノム微生物学会ワークショップ -ゲノムで繋がる微生物研究の新展開-」、2011 年度ゲノム微生物学会大会 (東北大学)、2011 年 8 月 21 日

〔図書〕(計3件)

1) 豊福雅典、野村暢彦*「微生物のコミュニケーション」環境と微生物の辞典、日本微生物生態学会編、朝倉書店 (2013(印刷中))(著書)

2) 豊福雅典、野村暢彦*「微生物もコミュニケーションしているってほんと?」、ひらく、ひらく「バイオの世界」—14歳からの生物工学入門—、日本生物工学会編、(株)化学同人 136-137 (2012) (著書)

3) 大浦啓、田代陽介、豊福雅典、中島敏明、内山裕夫、野村暢彦* ナフタレン誘導体による運動性抑制を介した緑膿菌バイオフィルム制御 環境バイオテクノロジー学会誌, 11:61-67 (2011) (総説)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 暢彦 (NOMURA NOBUHIKO)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：60292520

(2) 研究分担者

中村 幸治 (NAKAMURA KOUJI)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：40212097