

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650105

研究課題名(和文)自然界から分離した細胞外小胞は、微生物へのシグナル運搬能を有するのか？

研究課題名(英文) Does bacterial membrane vesicles isolated from environmental samples possess a role of carriers for bacterial signals

研究代表者

野村 暢彦 (NOMURA, Nobuhiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60292520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、多くの細菌が細胞外に小胞(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。しかし、それらはモデル細菌で実験室内つまり人工的に調整されたベシクルを解析しているに過ぎない。そこで本研究は、「実環境サンプルから細胞外小胞(ベシクル)を分離し、それが異種細菌間情報伝達のシグナル運搬役となりうるか？」を検証することで、自然界に存在しているベシクルが微生物に対して機能しうるか否かを解析した。

研究成果の概要(英文)：Almost bacteria naturally secrete sphere shaped vesicles that are approximately 50 to 250 nm. These vesicles are mainly composed of cellular membrane and hence called membrane vesicles (MVs). It has been reported about MV, but they were about MV of model bacteria. It doesn't have been reported about MV from environmental samples. Here, we investigated that bacterial membrane vesicles isolated from environmental samples include a role as a carrier of bacterial signals.

研究分野：微生物

キーワード：メンブランベシクル

## 1. 研究開始当初の背景

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。

一方、ほとんどの細菌は細胞外に膜小胞(メンブランベシクル(MV))を分泌することが明らかになってきた。MVは細菌が細胞外に生産する数十~数百nmの膜小胞体で、その中にDNA, RNA, タンパクさらに上記細菌シグナルが含まれている。その機能については諸説あるものの、明らかになっていない。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。

しかし、それらはモデル細菌のみでの研究であり、自然環境由来の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、非常に興味深くかつ意義深い。

つまり、多くの細菌が細胞外に小胞(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が、しかし、それらはモデル細菌で実験室内つまり人工的に調整されたベシクルを解析しているに過ぎない。そこで本研究は、「実環境サンプルから細胞外小胞(ベシクル)を分離し、それが異種細菌間情報伝達のシグナル運搬役となりうるか?」を検証することで、自然界に存在しているベシクルが微生物に対して機能しうるか否かを明らかにする。

このことは、微生物生態学が細胞のみに着目し研究されているが、自然界ではベシクルのような細胞外因子を含めた相互作用が存在し、微生物生態学を理解するには細胞外にも着目することを啓蒙することになる重要な知見を与える。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、「実環境由来の細胞外小胞(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、種々の活性汚泥からベシクルを分離し、その中のシグナルを解析し、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探る。

自然界に存在する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、微生物生態学の学術的寄与のみにとどまらず、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しても大いに期待出来る。

## 3. 研究の方法

### (1) ベシクルの調製

細胞外小胞ベシクルの精製法は構築済みであり、必要に応じてコントロールとして種々バクテリアのベシクルを調製し供給が可能である。培養条件は、LB培地を用いて、本培養は初期菌体濃度が $OD_{600}=0.01$ となるように植菌する。*P. aeruginosa*, *P. putida*等は、37℃で培養した。それ以外の株については30℃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。Pseudomonas quinolone signal (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。

一方、実環境中の種々活性汚泥をサンプリングする。それらから、ベシクルを分離精製する。ベシクルの量が少ない場合は、必要に応じて密度勾配超遠心法により濃縮を行う。

得られたベシクルについて、電子顕微鏡観察により粒子形状を確認する。さらに、必要に応じて光散乱法によって粒径および形状を解析する。これらの解析により、ベシクルとしての特徴付けを行う。

## (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

## (3) 活性汚泥の微生物叢解析

低泥中の微生物叢および単離を行う。微生物叢は 16SrDNA に基づいた解析を行う。微生物単離は細菌に絞り、適宜培地組成および培養条件検討を行い出来るだけ多様なスクリーニングを行う。そして、グラム染色及び 16SrDNA 等による同定を行い、グラム陰性・陽性で 2 グループに分割する。

## (4) 成分分析

特にシグナル化合物について調べる。

シグナルに関しては、LC-MS を使用し、アシル化ラクトホモセリン系・キノロン系・インドール系・脂肪酸系のそれぞれ骨格で分類解析する。シグナル化合物の諸性質の解析に必要な材料、設備等はそろっている。これまでに当研究室は多くのシグナル化合物について同定を行っている。さらに、必要に応じてそれぞれのシグナルのレポーター株も使用し、実際に抽出されたそれらシグナルが機能するかを確かめる。

## 4. 研究成果

活性汚泥からメンブランベシクルの精製を行い、得られた産物を電子顕微鏡による解析を行った。その結果、得られたサンプルに数十 nm~数百 nm の直径のメンブランベシクルの存在が確認された(図 1)。

また、それらのメンブランベシクル中に細菌シグナルが含まれているかを調べた。その結果、特に特徴的なシグナルが存在することが示された。

各活性汚泥中の微生物叢を調べたところ、多くの種類のグラム陰性細菌をはじめ、グラム陽性細菌が存在することが示された。この結果は、活性汚泥中にメンブランベシクルの存在そして細菌シグナルの存在と十分に相関が得られた。

本成果は、環境中にメンブランベシクルが

存在し、さらに細菌シグナルの運搬を役担っていることが示唆される。

先に説明したようにシグナルに着目した制御が注目されつつある。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、未解明のままであり、シグナル分子自体が直接細胞間を行き来していると理解されている。本成果により、環境サンプル中にメンブランベシクルが存在し、さらに細菌シグナルが存在することを示すことが出来た。よって、自然界でもベシクルが運び屋となり、シグナルを異種の細菌間で効率的に移動させているという仮説がたえられる。

これまで、複合微生物系などにおける異種微生物間コミュニケーションにおいて、実環境から分離されたベシクルの機能に着目された研究例はなく、本成果は極めて独創性の高い成果である。本成果は、学術的に貢献すると共に新たな複合微生物系制御法の開拓



図 1 環境サンプルからのメンブランベシクル

に寄与する。今後、さらに自然界で細胞外の空間に存在するベシクルが、異種細菌間のコミュニケーションに寄与しているのかを理解することによって、環境中での複合微生物系あるいはバイオフィルムなどの微生物生態全体像に迫れることが期待される。

#### 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1件)(査読有り)

1) Nakao, R., K. Kikushima, H. Higuchi, N. Obana, N. Nomura, D. Bai, M. Ohnishi, and H. Senpuku. A novel approach for purification and selective capture of membrane vesicles of the periodontopathic bacterium, *Porphyromonas gingivalis*: membrane vesicles bind to magnetic beads coated with epoxygroups in a noncovalent, species-specific manner. PLoS One, 2014. 9(5),e95137.Doi:10.1371/journal.pone.0095137

[学会発表](計1件)

(招待講演)

1) 豊福雅典、Leo Eberl、野村暢彦：「メンブランベシクルから見えてくる新たな微生物間コミュニケーション、バイオフィルム像」、生物工学会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌) 2014年9月9日-9月10日

[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・教授

研究者番号：60292520