

令和元年6月18日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06189

研究課題名(和文)メンブランベシクルによって放出される細胞外RNAを紐解く

研究課題名(英文)Decoding extracellular RNA released through bacterial membrane vesicles

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) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：細菌は細胞外に数百ナノメートル程度のメンブランベシクル(MV)を放出することが知られている。MVは微生物間コミュニケーションや遺伝子の水平伝播など、細菌の生存や進化で重要な多くのプロセスに関与しており、宿主に対する病原性発揮にも関わっていることが報告されている。さらには、免疫誘導性を示すことからワクチン開発にも利用されており、ガンを標的としたドラッグデリバリーシステムのプラットフォームとして注目を浴びている。MVにRNAが含まれているが、その詳細な解析は行われておらず、機能や生物学的な意義は未知であった。本研究では、MVに含まれるRNAを解析することにより、MVの新規形成機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外膜小胞は、細菌以外のほとんどの生物が産生することが明らかとなっており、その機能や応用について注目が集まっている。細菌も50年以上前からメンブランベシクル(MV)と呼ばれる細胞外膜小胞を形成することが分かっていたが、その形成機構については完全に明らかにならなかった。我々は、世界で初めて細菌間で共通したMV形成機構を明らかにした。本研究により、MV研究と応用が一気に進むと期待される。

研究成果の概要(英文)：Bacteria release membrane vesicles (MVs) from their cells that range in diameter from 40-400nm. MVs serve various functions, including the transport of virulence factors, DNA transfer, and bacterial communication. They are used as technical platforms for applications in biomedicine and nanotechnology. One of the common cargo of MVs is RNA which functions has not been understood in details. In order to gain insight of the RNA associated with MVs we sequenced the RNA isolated from MVs of several bacteria. By focusing on the accumulated mRNA in MVs, this led us to discover a gene that is involved in MV biogenesis. This gene encoding a cell wall degrading enzyme is well conserved among bacteria. We show showed that this enzyme trigger explosive cell lysis and bubbling cell death through which MVs are generated in Gram-negative and Gram-positive bacteria. The results provides new concepts in MV research.

研究分野：微生物学

キーワード：メンブランベシクル 細菌間相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌は細胞外に数百ナノメートル程度のメンブレンベシクル(MV)を放出することが知られている。MVは微生物間コミュニケーションや遺伝子の水平伝播など、細菌の生存や進化で重要な多くのプロセスに関与しており、宿主に対する病原性発揮にも関わっていることが報告されている。さらには、MVは免疫誘導性を示すことからワクチン開発にも利用されており、ガンを標的としたドラッグデリバリーシステムのプラットフォームとしても注目を浴びている。MVにRNAが含まれているが、その詳細な解析は行われておらず、機能や生物学的な意義は未知であった。細胞外RNA(以下 exRNA)の研究は主に動物細胞で進んできており、exRNAが細胞外膜小胞(エクソソーム)を介して伝達され、機能することが報告されていた。さらには、血中や尿中のexRNAは特定の病気の診断に使えることも示されている。動物細胞でexRNAの伝達を担うエクソソームと、細菌が産生するMVはいずれも膜小胞であり、細胞間物質輸送を担うといった点で非常に似ている。実際にMVにexRNA含まれるとの報告はあったが、その中身や機能については解析されていなかった。さらに、こうした、RNAがどのようにMVに包括されるのかについては、長い間疑問となっていた。既存の研究では細胞膜がたわむ(blebbing)ようにして、MVが形成されることされていた。しかしながら、グラム陰性菌のような、細胞内膜を持つ細菌でどのようにして、RNAがMVに包括されるのかについて、その説明がなされないままであった。

2. 研究の目的

細胞外に存在するRNA(exRNA)が細胞間で伝達されることが明らかとなってきた。細菌におけるexRNAはその存在すらよく分かっていない未知の分野であったため、本課題ではMVに含まれるRNAを解読し、その生物学的な意義を問うことにした。

3. 研究の方法

(1)MVに付随するRNAの解析

細菌の上清から密度勾配遠心方法によって、MVを回収し、精製されたMVからRNAを抽出した。必要に応じて、細胞のRNAも回収し、MVのRNAプロファイルと比較した。

(2)exRNAの機能解明

研究成果により、exRNAがMVを形成している細胞の生理状態を反映していることが明らかとなった。そこで、それぞれのmRNAがコードされている遺伝子欠損させて、その株を解析することで、exRNAがもたらす情報の生物学的な意味を明らかにしていった。

(3)イメージング

MV形成機構について、共焦点顕微鏡や電子顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

MV細胞と比較してMVに濃縮されているRNAを解析すると、ある特定のmRNAが多く含まれることが明らかになった。そこからヒントを得て解析を進めたところ、緑膿菌において、MV形成に関わるタンパク質をコードするmRNAがMVに含まれることが明らかとなった。当該タンパク質は細胞壁の分解酵素であり、その発現によって、細胞壁を分解された細胞が破裂し、破裂した細胞の膜断片が再会合する形で、MV形成が行われることを明らかにした。この細胞壁分解酵

素は、通常は全細胞の1%以下でのみ発現しており、全細胞を対象にした通常のRNA-seqではその発現量が平均化され、検出されづらい。しかしながら、MVを用いることで、集団中の1%の細胞の転写産物を濃縮し、解析できることが明らかになった。

こうした成果を受けて解析を進めたところ、特筆すべきものとして、グラム陽性菌である枯草菌のMV形成機構を世界ではじめて解明した。MV研究の多くはグラム陰性菌で行われてきており、グラム陽性菌のMV形成機構についての知見は皆無であった。前述の通り、MVに含まれるRNAの解析により、細胞壁分解酵素に着目したところ、枯草菌において、プロファージ領域にコードされる細胞壁分解酵素がMV形成に関わることを明らかにした。その詳細な機構を解析すると、細胞壁分解酵素が枯草菌の厚い細胞壁に穴をあけ、そこから細胞膜が押し出される形でMVが形成されることが明らかとなった。この機構は細胞死を伴うことから blebbing cell death と名付けた。本細胞壁分解酵素は多くの細菌に保存されていることから、細菌間で共通したMV形成機構であると考えられる。

RNAを含めた核酸がどのようにしてMVに包括されるのかについて、疑問となっていたが、グラム陰性菌での細胞破裂や、グラム陽性菌での blebbing cell death での研究成果によって、その包括経路が説明できるようになった。また、従来では、blebbing 以外の、新たなMV形成機構を明らかにしたことで、MVにいくつかの種類があることを示すことができた。MVはこれまで一緒にたにされて解析されることが多かったが、我々の成果はMVの多様性を明らかにし、種類に応じてその機能も異なることを示唆した。MV形成機構については、まだその全貌は明らかになっておらず引き続き解析中である。

MVの機能について、我々はMVが細菌間コミュニケーションに関与することを明らかにしてきたが、放出されたMVが環境中に残存している細菌間コミュニケーション物質を取り込み、運搬することも明らかにした。細菌間コミュニケーション物質は環境中に排出されると、周囲の細菌が自由にアクセスできると思われていたが、MVによってその化合物を差し押さえることができることが明らかとなり、細菌間コミュニケーションの新たなモデルを提唱した。

以上のように本研究事業では、MVに含まれるRNAを解析することによって、MVの新奇形成機構を明らかにした。本機構によって、blebbingとは異なるタイプのMVが形成されることを明らかにし、MVの多様性と機能に関する新たな知見を与えた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 件)

1. †Andreoni F, †Toyofuku M, Menzi C, Kalawong R, Mairpady Shambat S, Francois P, *Zinkernagel AS, *Eberl L. Antibiotics stimulate vesicles formation in *Staphylococcus aureus* in a phage-dependent and independent fashion and via different routes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, doi:10.1128/AAC.01439-18, in press.
2. Nakanishi Y, Yamamoto T, Obana N, Toyofuku M, *Nomura N, Kaneko A. Spatial distribution and chemical tolerance of *Streptococcus mutans* within dual-species cariogenic biofilms. *Microbes and Environments*, doi:10.1264/jsme2.ME18113, in press.
3. *Toyofuku M, Nomura N, *Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*,17:13-24, 2019.
4. Morinaga K, Yamamoto T, Nomura N, *Toyofuku M. *Paracoccus denitrificans* can utilize various long-chain N-acylhomoserine lactones and sequester them in membrane vesicles. *Environmental Microbiology Reports*,10: 651-654, 2018.

5. 森永花菜、鬼澤里奈、野村暢彦、**豊福雅典**「細胞間情報伝達のデジタル化」*生物工学会誌*, 96:451-543, 2018.
6. 山本達也、野村暢彦、**豊福雅典**「細菌が放出するベシクルの新奇形成機構の発見」*オレオサイエンス*, 18:227-231, 2018.
7. **豊福雅典**, 森永花菜, 安田まり奈, 野村暢彦「ベシクルから視えてくる細菌間相互作用の姿」*日本微生物生態学会誌*, 33:43-49, 2018.
8. **豊福雅典**「細菌が放出する膜小胞の新たな展開」*化学と生物*, 56:79-80, 2018.
9. ***Toyofuku M**, Cárcamo-Oyarce G, Yamamoto T, Eisenstein F, Hsiao C, Kurosawa M, Gademann K, *Pillhofer M, Nomura N, and *Eberl L. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nature Communications*, 8:481, 2017.
10. ***Toyofuku M**, Nomura N. What will membrane vesicles (MVs) bring to bacterial communication? *Microbes and Environments*, 32:185-187, 2017.

〔学会発表〕(計 11件)

1. **豊福雅典**「バクテリアが放出する膜小胞の利用に向けて」放線菌学会学術講演会 2019年3月14日
2. **豊福雅典**「膜小胞を介した細菌間の情報伝達」化学コミュニケーションのフロンティア第2回若手シンポジウム 一橋大学一橋講堂 2019年1月10日
3. **豊福雅典**「低分子化合物及び膜小胞を介した細菌間相互作用に関する研究」日本農芸化学会 2018年度第3回関東支部例会 東京大学弥生講堂一条ホール 2018年12月15日
4. **豊福雅典**「細菌のメンブレンベシクル形成機構にまつわるドグマへの挑戦」第28回植物細菌病談話会 高知大学 2018年8月23日
5. **豊福雅典**「Membrane vesicle formation through cell death」理化学研究所セミナー 2018年7月17日
6. **豊福雅典**「Challenging the dogma of bacterial membrane vesicle formation」10th Asian Symposium on Microbial Ecology, 2018年7月12-13日、沖縄コンベンションセンター
7. **豊福雅典**「メンブレンベシクルからみえてきた細菌の多様な情報戦略」第32回日本微生物生態学会、2018年7月12-13日、沖縄コンベンションセンター
8. **豊福雅典**「低分子化合物及び膜小胞を介した細菌間相互作用に関する研究」日本農芸化学会 2018年度大会, 名古屋, 名城大学, 2018年3月15日-3月18日.
9. **豊福雅典**「メンブレンベシクルを介した細菌間コミュニケーション」日本細菌学会総会, 福岡国際会議場, 2018年3月27日-29日.
10. **豊福雅典**, 森永花菜, Leo Eberl, 野村暢彦「細菌によるデジタルな情報伝達!？」第69回日本生物工学会 2017年度大会, 早稲田大学, 2017年9月11日-14日.
11. **Masanori Toyofuku**, Nobuhiko Nomura, Leo Eberl. “Membrane vesicle formation through cell death” *FEMS Microbiology Congress 2017*, Valencia, Spain, July 9-13, 2017.

〔図書〕(計 3件)

1. ***Toyofuku M**, *Yoon SS. Nitric oxide, an old molecule with noble functions in *Pseudomonas aeruginosa* biology. *In: Advances in Microbial Physiology*, Elsevier, 72:pp 117-145, 2018.
2. **豊福雅典**, 野村暢彦「細菌が放出する細胞外膜小胞」*現代コロイド界面化学の基礎*, 丸

善出版株式会社，pp 414-415, 2018.

3. **豊福雅典**「クオラムセンシング」**食と微生物の辞典**，朝倉書店，pp 380-381, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.envr.tsukuba.ac.jp/~microbi/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：野村暢彦

ローマ字氏名：Nomura Nobuhiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。