

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02920

研究課題名（和文）細菌-宿主細胞インターフェースにおける膜小胞を介した感染戦略の機構解明

研究課題名（英文）Membrane vesicle-mediated infection strategy at the bacteria-host cell interface

研究代表者

田代 陽介（TASHIRO, YOSUKE）

静岡大学・工学部・講師

研究者番号：30589528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：病原細菌が細胞外に放出する微粒子「膜小胞」は、感染における重要な病原因子運搬体として知られている。一方、細菌は宿主細胞に付着した「バイオフィーム」という集合体の状態をとると、膜小胞を活発に形成する。本研究では、バイオフィームで放出された膜小胞が、免疫細胞の一つであるマクロファージのサイトカイン産生を誘発し、強い炎症作用を有することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑膿菌をはじめとした感染症は国内のみならず世界で重要視される深刻な問題である。胃潰瘍や髄膜炎菌感染など、多くの重篤感染症において、細菌感染初期過程の膜小胞の重要性が知られている。本研究では、バイオフィームという宿主感染状態となった際に放出される膜小胞が生体に与える影響を解明しており、あらゆる細菌感染症の治療に向けた重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：Membrane vesicles (MVs), nanoparticles released by pathogenic bacteria, are important virulence factor carriers in infectious diseases. Bacteria actively release MVs in the biofilms, aggregated states attached to host cells. In the present study, MVs released in biofilms were found to induce cytokine production by macrophages, one of the immune cells, and to have a strong inflammatory effect.

研究分野：分子微生物学

キーワード：膜小胞 バイオフィーム 緑膿菌 マクロファージ カルジオリピン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌は多様な感染機構を有しており、感染メカニズムの理解は病原性制御に必須の情報である。多くの病原細菌は細胞外に直径 20~400 nm の膜小胞を放出しており、膜小胞は動物・植物等の細胞へ病原因子を運搬する機能を有している。

病原細菌はバイオフィーム（微生物とその分泌物から構成される構造体）を形成して上皮細胞に固着することが知られている。浮遊状態とバイオフィーム状態では遺伝子発現プロファイルが異なり、あたかも別の細菌かのような表現型を示す。膜小胞はバイオフィーム状態で多量に放出されることが知られているが、膜小胞を介した宿主細胞への病原性はこれまで扱いやすい浮遊細菌が放出した膜小胞を対象にして解析されてきた。しかし実際の感染では細菌は宿主細胞の防御機構を回避しつつバイオフィームを形成していることから、その状態で放出される膜小胞による感染機構の理解が、難治感染症の克服のためには極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、細菌-宿主細胞インターフェースにおいて、膜小胞を介した感染がどのような機構で引き起こされるのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株と培養方法

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株をモデル細菌として用い、LB 培地で 37 度で培養した。500 mL フラスコに入った 100 mL 培地で 200 rpm の振盪培養した細菌を浮遊状態、シャーレに 10 mL の培地を入れ静置培養した細菌をバイオフィーム状態として実験を行った。

(2) リン脂質の解析

細胞膜のリン脂質組成は薄層クロマトグラフィーにより解析した。また、カルジオリピンの生成の有無は高速液体クロマトグラフィーにより確認した。

(3) 膜小胞の抽出と定量方法

細菌培養液を遠心した後、その上清をフィルター滅菌し、超遠心することにより膜小胞を回収した。膜小胞の定量には、脂質二重膜標識試薬 FM4-64 を用いた。また、膜小胞の精製は密度勾配遠心法により行った。

(4) 膜小胞のサイトカイン産生誘発能の影響評価

精製した膜小胞をマクロファージに添加し、マクロファージのサイトカイン産生をそれぞれの遺伝子転写量で評価した。RNA を抽出し逆転写した DNA に対して定量的 PCR を行った。

4. 研究成果

(1) 膜小胞放出とカルジオリピンとの関連

緑膿菌がバイオフィーム状態で産生する膜小胞の特性理解に向け、細胞膜の構成成分であるリン脂質の組成に着目した。浮遊状態ならびにバイオフィーム状態における細菌のリン脂質組成を調べたところ、バイオフィーム状態でカルジオリピンの比率が高いことが示された。また、カルジオリピンの細胞内局在を 10-Nonylacridine orange (NAO) を用いて蛍光顕微鏡で観察したところ、バイオフィーム状態の細菌で

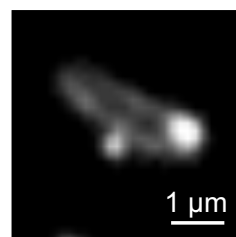


図1 緑膿菌のカルジオリピン局在

は細胞極ならびに膜小胞放出部位に局在していた (図 1)。カルジオリピンは高曲率膜に集積する特徴を有することから、カルジオリピンが高濃度に局在することで細胞膜の曲率を高めている可能性が考えられた。

次にカルジオリピンがバイオフィーム形成時における膜小胞産生増大に関与するかを調べるため、緑膿菌のカルジオリピン非合成欠損株の作製を試みた。PAO1 株においてはフォスホリパーゼ D 活性を有すると予測される遺伝子が 6 つ存在しており、その 6 重欠損株を作製したところ、カルジオリピン合成が完全に欠失した。さらに各遺伝子の発現プラスミドを作製し 6 重欠損株に導入したところ、3 つの遺伝子がカルジオリピン合成を担っていた。実際にそれら遺伝子の 3 重欠損株でもカルジオリピン合成が見られなかった。しかし予想に反し、カルジオリピン非合成株の膜小胞形成量は野生株と比較して顕著な差が見られなかった。以上のことから、バイオフィーム状態の細菌ではカルジオリピンは膜小胞放出部位に集積するものの、そのリン脂質自体は膜小胞産生量に影響を与えないことが示された。

(2) バイオフィーム由来膜小胞によるマクロファージのサイトカイン産生誘発

浮遊状態とバイオフィーム状態で形成される膜小胞がマクロファージの免疫応答に与える影響を解析した。緑膿菌がバイオフィームを形成した際に放出する膜小胞は、マクロファージの IL-1 β 、IL-6、IL-12p40 などのサイトカイン産生を誘発していた (図 1)。リポ多糖の LipidA に架橋するポリミキシン B をバイオフィーム状態ならびに浮遊状態の培養液由来の膜小胞と反応させ、マクロファージに添加してそのサイトカイン活性を定量したところ、その活性はポリミキシン B 添加により大幅に減少した。一方、野生株とカルジオリピン欠損株の膜小胞とでは、サイトカイン産生に変化は見られなかった。以上の結果から、バイオフィーム由来の膜小胞のリポ多糖がサイトカイン誘発に大きく寄与することが示された。

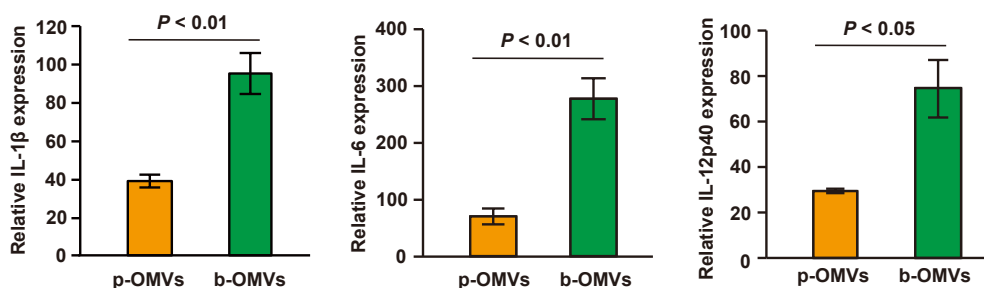


図2 緑膿菌の浮遊状態由来 (p-OMVs) ならびにバイオフィーム由来 (b-OMVs) の膜小胞をマクロファージに添加した際のサイトカイン誘発能

マクロファージの膜小胞認識には細胞膜上の Tol-like receptor が関与すると考えられたため、リポタンパク質等を認識する TLR2 ならびにリポ多糖を認識する TLR4 の発現を比較したところ、バイオフィーム由来膜小胞では特に TLR4 の発現に変動が見られた。本結果においても、バイオフィーム由来の膜小胞のリポ多糖がサイトカイン誘発に大きく寄与することが示唆された。

バイオフィーム由来の膜小胞を熱処理または超音波破碎により物理的崩壊させると、マクロファージのサイトカイン産生誘発効果が高まることが示された。一方、浮遊状態由来の膜小胞にはそのような傾向は見られなかった。さらに膜小胞を物理的崩壊させてもマクロファージの細胞傷害性には変化が見られなかった。以上の結果から、バイオフィーム由来の膜小胞は宿主細胞の免疫を誘発する物質を内包しており、膜小胞の溶解等が起こることで炎症誘発能が高まることが示された。

(3) 総括

本研究では、緑膿菌がバイオフィルムを形成した際に細胞膜上のカルジオリピン局在部位から膜小胞形成が活発に行われ、放出された膜小胞は浮遊状態に比べて高い免疫誘発能を有することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takaki Kotaro, Tahara Yuhei O, Nakamichi Nao, Hasegawa Yusuke, Shintani Masaki, Ohkuma Moriya, Miyata Makoto, Futamata Hiroyuki, Tashiro Yosuke	4. 巻 86
2. 論文標題 Multilamellar and multivesicular outer membrane vesicles produced by a <i>Buttiauxella agrestis</i> tolB mutant	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01131-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.01131-20	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 Abdul Aziz Fatma Azwani, Suzuki Kenshi, Honjo Masahiro, Amano Koki, Mohd Din Abd Rahman Jabir Bin, Tashiro Yosuke, Futamata Hiroyuki	4. 巻 131
2. 論文標題 Coexisting mechanisms of bacterial community are changeable even under similar stable conditions in a chemostat culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 77 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.09.009	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 該当する
1. 著者名 Tashiro Yosuke, Takaki Kotaro, Futamata Hiroyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Targeted delivery using membrane vesicles in prokaryotes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 114 ~ 120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.16.0_114	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 Aziz Fatma Azwani Abdul, Suzuki Kenshi, Moriuchi Ryota, Dohra Hideo, Tashiro Yosuke, Futamata Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Phenol-Degrading <i>Variovorax boronicumulans</i> Strain HAB-30	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01478-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01478-19	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 Tashiro Yosuke	4. 巻 44
2. 論文標題 Vesicle Formation by Microbes: Approach from Microbiology to Membrane Science	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MEMBRANE	6. 最初と最後の頁 96-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5360/membrane.44.96	査読の有無 無
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 Nao Nakamichi, Ryota Moriuchi, Hideo Dohra, Hiroyuki Futamata, Yosuke Tashiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete genome sequence of <i>Buttiauxella agrestis</i> DSM 9389	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00301-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00301-21	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 Sharmin Aktar, Yuhi Okamoto, So Ueno, Yuhei O Tahara, Masayoshi Imaizumi, Masaki Shintani, Makoto Miyata, Hiroyuki Futamata, Hideaki Nojiri, Yosuke Tashiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Incorporation of plasmid DNA into bacterial membrane vesicles by peptidoglycan defects in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 747606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.747606	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 Yosuke Tashiro	4. 巻 86
2. 論文標題 Bacterial membrane vesicles with multiple lipid bilayers: vesicles harboring organelle-like structures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 967-973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac066	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 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中道菜緒、森内良太、道羅英夫、二又裕之、田代陽介
2. 発表標題 同属細菌間ゲノム比較とランダム変異解析による膜小胞過剰形成の機構解明
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 細菌膜観察で見出された型破りな膜小胞形成
3. 学会等名 日本農芸化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 細菌が生産する小胞の機能と形成機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 微生物が形成する微粒子の機能解明と医療応用への展開
3. 学会等名 静岡大学食品・生物産業創出拠点研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 奇想天外な細菌表層変化を解き明かす、異彩膜小胞の形成観察
3. 学会等名 ゲノム微生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 細菌の細胞外微粒子とは何者なのか？-多様な膜小胞放出機構の謎に迫る-
3. 学会等名 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中道菜緒、二又裕之、田代陽介
2. 発表標題 細菌膜小胞形成における細胞膜表面のリポ多糖欠失の影響
3. 学会等名 膜シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中道菜緒、二又裕之、田代陽介
2. 発表標題 膜小胞過剰形成Buttiauxella属細菌における小胞放出関連因子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高原翠夏人、平山悟、中尾龍馬、二又裕之、田代陽介
2. 発表標題 バイオフィルム由来膜小胞による免疫応答促進
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 細菌が形成する細胞外小胞の多様性
3. 学会等名 日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 緑膿菌の付着状態におけるナノ粒子放出と感染戦略
3. 学会等名 日本生化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 細菌ベシクルの複雑性と多機能性：リボソームとは何が違うのか？
3. 学会等名 日本生物工学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中道菜緒、二又裕之、田代陽介
2. 発表標題 膜小胞過剰形成Buttiauxella属細菌における小胞形成関連因子の探索
3. 学会等名 日本膜学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 ナノ構造の可視化で切り拓く細菌膜小胞の特性と形成機構
3. 学会等名 日本農芸化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野想、塩田拓也、三浦わかな、二又裕之、田代陽介
2. 発表標題 緑膿菌膜小胞形成部位に局在するカルジオリピンの合成機構及び生理機能
3. 学会等名 日本農芸化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中道菜緒、二又裕之、田代陽介
2. 発表標題 膜小胞過剰分泌性Buttiauxella属細菌における小胞分泌機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 環境変化に应答する細菌の膜脂質変動と膜小胞分泌
3. 学会等名 日本細菌学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田代陽介
2. 発表標題 微生物由来の膜小胞が魅せる多彩な機能
3. 学会等名 油化学会東海支部講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Tashiro, Takuya Shiota, Minato Takahara, Masaki Shintani, Hiroyuki Futamata, Kazuhide Kimbara
2. 発表標題 Outer membrane vesicle formation by Pseudomonas aeruginosa biofilm cells
3. 学会等名 Eurobiofilms 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代陽介、二又裕之
2. 発表標題 細菌の膜小胞形成観察に寄与するテクノロジー
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代陽介、塩田拓也、三浦わかな、新谷政己、金原和秀、二又裕之
2. 発表標題 緑膿菌の膜小胞分泌におけるカルジオリピンの機能
3. 学会等名 日本細菌学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sharmin Aktar、二又裕之、田代陽介
2. 発表標題 大腸菌におけるプラスミド含有膜小胞の形成向上
3. 学会等名 日本細菌学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masanori Toyofuku, Yosuke Tashiro, Nobuhiko Nomura, Leo Eberl	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 251
3. 書名 Bacterial membrane vesicles -Biogenesis, functions and applications	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究室ホームページ http://cheme.eng.shizuoka.ac.jp/wordpress/tashiro/ 静岡大学教員データベース https://tdb.shizuoka.ac.jp/RDB/public/Default2.aspx?id=11101&l=0 Researchmap https://researchmap.jp/7000011594</p>

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
研究分担者	金原 和秀 (Kimbara Kazuhide) (30225122)	静岡大学・工学部・教授 (13801)	
研究分担者	中尾 龍馬 (Nakao Ryoma) (10370959)	国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官 (82603)	

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