

細菌が産生する膜小胞形成に関与する遺伝子の同定

鈴木 悠世（筑波大学生物学類） 指導教員：豊福 雅典（筑波大学生命環境系）

背景・目的

多くの細菌は環境中で相互作用しながら存在しており、その一例としてシグナル物質を用いた細菌間コミュニケーションが挙げられる¹⁾。このうち、菌体密度依存的な細菌間コミュニケーションをクォラムセンシング(Quorum Sensing; QS)と呼ぶ。QSによって制御される集団的挙動として、毒素産生やバイオフィーム形成などが知られている²⁾。多くのグラム陰性細菌ではQSシグナル物質としてアシル化ホモセリンラクトン(N-Acyl homoserine lactone; AHL)を利用することが報告されている^{3,4)}。AHLは化学修飾や側鎖長によって多様性が生み出されており、特にC12以上の長鎖AHLの多くは細菌が自身の膜から形成する膜小胞(Membrane Vesicle; MV)に内包されて伝達されることが明らかになっている⁵⁾。他にもMVは様々な生物学的機能をもつことが示されており、その例として遺伝子水平伝播やQS、毒素運搬、ファージに対するデコイなどが挙げられる⁶⁾。また、産業・医療の分野においても生体触媒やワクチンといった応用例がある⁶⁾。

*Paracoccus denitrificans*は土壌に存在する脱窒細菌として知られる、非運動性のグラム陰性細菌である。当研究室の先行研究によって、*P. denitrificans*はQSシグナル物質として長鎖AHLの一種であるC16-HSL(Homoserine lactone)をMVに内包していることが明らかになった⁷⁾。また、MV一粒にはQSを誘導するために十分なC16-HSLが内包されていることや、細胞指向性が存在することが報告されている⁷⁾。さらに、C16-HSLは細胞間の付着因子の発現を抑制することで凝集体形成を阻害することが明らかになった⁷⁾。これらのことから、*P. denitrificans*のQSによる集団制御においてMVがシグナル物質の送達を担う重要なキャリアーであることが示唆されている。このようにMVを介したシグナル伝達については知見が得られているが、MVの形成メカニズムは完全には解明されていない。そこで、本研究ではMVを介したQSのモデル菌として*P. denitrificans*を用いることでハイスループットなスクリーニング系を構築し、MV形成メカニズムの解明を目指した。

実験方法

1) 供試菌株

本研究で用いた株を以下の表にまとめた。

表 1. 本研究で用いた菌株

Strains	Relevant characteristics
<i>P. denitrificans</i>	
Pd1222	野生株
<i>ΔpdnI</i>	Pd1222のシグナル産生遺伝子 <i>pdnI</i> の欠損株
<i>ΔPden_0684</i>	本研究のミュータントライブラリーの親株としたMV形成量が増加した株
<i>Chromobacterium violaceum</i>	
VIR24	自身ではC16-HSLを産生しないが受容することで紫色の色素を産生するレポーター株

2) MV形成に関わる因子のスクリーニング

MV高形成株に対してランダムに変異を入れたトランスポゾン(Tn)ミュータントライブラリーを作製した。得られたミュータントとシグナルレポーター株を1.5%の寒天培地上で8mm間隔で植菌し、48h、30℃で培養し、親株と比較して伝達したシグナル量が異なるミュータントを選抜し、これを一次スクリーニングとした。二次スクリーニングとして一次スクリーニングで得られた株について同様の操作を行ない、再現性を確認した。

この後、選抜された株のMV形成量を定量した。定量に際しては、4ml TSB培地に植菌し、37℃、190rpmで一晩前培養し、新たな4ml TSB培地にO.D₆₀₀=0.01になるように植菌した。これを37℃、190rpm、24hで本培養し、培養後の濁度を測定した。培養上清を0.22μmフィルターで滅菌し、4℃、1h、150,000xgで遠心分離を行い、MVを回収した。回収したMVは脂質染色剤であるFM1-43FXで染色し、その蛍光強度を本培養後の濁度で除した値を算出した。これを親株と比較することで三次スクリーニングとした。

一連のスクリーニングによって選抜された株に対してシーケンス解析を行い、Tnが挿入された遺伝子を確認した。

結果・考察

合計で6716株のTnミュータントをスクリーニングし、37株が選抜された。これらの株をシーケンス解析した結果、LPSの合成に関わる遺伝子、鉄のキレートに関わるタンパク質やABCトランスポーター等の膜タンパク質をコードする遺伝子、好気呼吸に関わる遺伝子にTnが挿入されていることが明らかになった。このうち、31株においてMV形成量が低下したことから、MV形成を促進する遺伝子の存在が示唆された。

これまでの研究ではMV形成が膜の不安定化による受動的な現象であるとされている。しかし、本研究により、その他のMV形成メカニズムが存在する可能性も示された。

今後はこれらの遺伝子のノックアウト株を作製し、MV形成能やそのMVの特性について検証していく予定である。

参考文献

1) Whiteley M. et al. (2017) *Nature* **551**: 313-320.
2) Whitehead N.A. et al. (2001) *FEMS Microbiol Rev* **25**: 365-404.
3) Wagner-Döbler, I. et al. (2005) *Chembiochem*, **6**: 2195-2206.
4) Ochiai, S. et al. (2013) *Biosci Biotechnol Biochem*, **77**: 2436-2440.
5) Morinaga, K., et al. (2020). *Environmental Microbiology Reports*, **12**: 355-360.
6) Toyofuku, M., et al. (2019) *Nature Rev Microbiol*, **17**: 13-24.
7) Toyofuku M. et al. (2017) *ISME J* **11**:1504-1509.