

Paracoccus denitrificans Pd1222 を用いた細胞外膜小胞の伝達に関わる因子の探索

柏俣 青葉 (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】

多くの細菌は細胞外にシグナル物質を分泌するとともに環境中のシグナル物質を受け取ることで、コミュニケーションを行っている¹⁾。菌体濃度依存的なコミュニケーション機構は quorum sensing(QS)と呼ばれており、細菌集団の遺伝子発現を調節することで、集団の挙動を制御している。先行研究では、QS 機構を介して細菌の病原性や抗生物質産生、バイオフィーム形成といった重要な形質の制御が報告されており²⁾、本機構の理解と制御が求められている。

従来の QS 機構のモデルでは、細菌によって産生された QS シグナルが単純拡散によって細胞外へ放出され、周囲の細胞に伝達されると考えられていた³⁾。しかし、近年、QS シグナルを membrane vesicle (MV) と呼ばれる膜小胞に内包させることで細胞選択的に伝達していることが明らかとなった⁴⁾。MV とは、多くの細菌が自身の細胞膜から形成する直径 20~400 nm の球状の膜構造体のことである。その内部には核酸やタンパク質といった菌体由来成分が豊富に含まれることから、物質のキャリアとして機能することが報告されている。一部の細菌において、MV は細胞選択的な QS シグナルの伝達を可能にしているが、MV がどのように細胞を認識して付着し、QS シグナルのような内包物が伝達されているのか、その伝達機構のメカニズムについては未だに分かっていない。

土壌脱窒素細菌の *Paracoccus denitrificans* は、QS シグナルとしてアシル化ホモセリンラクトン(AHL)の一種である *N*-hexadecanoyl-L-homoserine lactone (C16-HSL) を産生することで知られている、非運動性のグラム陰性菌である。C16-HSL は長い炭素鎖を有することから高い疎水性を示す。当研究室の先行研究によって、*P. denitrificans* Pd1222 では C16-HSL が MV に濃縮されて細胞間で伝達されることが明らかとなった⁴⁾。また、*P. denitrificans* Pd1222 が放出した MV は異種細菌よりも同種細菌への付着性が高い様子が観察されており⁴⁾、MV が特定の細胞を認識できることが示唆されている。

このように、MV の内包物や付着に関して興味深い特徴のある *P. denitrificans* Pd1222 を用いることで、MV 伝達機構の解明に繋がると考え、研究を進めている。

MV 伝達機構の理解は環境中の微生物相互作用を理解する上で鍵となりえる。これは細菌集団の制御につながると考えられ、病原細菌による感染症の予防や治療、水処理技術の向上といった分野で私たちの生活に大きく貢献できると考えられる。本研究では、MV 伝達機構の解明の第一歩として、MV の伝達に関わる遺伝子を探索することを目的とした。

【実験方法】

1) 供試菌株

Paracoccus denitrificans Pd1222 $\Delta pdnI \Delta pxm$
pPROBE-NT_P_{lasB}-mNeonGreen Cp (Tc^r)

を用いた。自らは C16-HSL を生産しないが、外部からの C16-HSL には応答して、蛍光を発する *P. denitrificans* のレポーター株である。

2) MV の回収

P. denitrificans Pd1222 野生株を Tryptic Soy Broth (TSB) 培地にて培養し、定常期に培養上清を 4°C, 1 h, 150,000 xg で遠心分離を行うことで MV を回収した。

3) MV 伝達に関わる因子のスクリーニング

レポーター株に対してランダムに変異を入れたトランスポゾンミュータントライブラリーを作製した。得られたトランスポゾンミュータントを 2.5 μ g/ml テトラサイクリンを含んだ 100 μ l TSB 培地に植菌し、30°C, 400 rpm, 24 時間、液体培養した。元々のレポーター株と比べて MV に対する応答(蛍光強度)が異なるトランスポゾンミュータントを選抜し、これを 1 次スクリーニングとした。

続いて、1 次スクリーニングで選抜された株を 2.5 μ g/ml テトラサイクリンを含んだ 100 μ l TSB 培地に植菌し、30°C, 400 rpm, 24 時間、液体培養した。培養後のトランスポゾンミュータントに対して、MV を添加した場合と C16-HSL を添加した場合で蛍光を比較し、蛍光強度の変化が MV 依存的なものか検証する 2 次スクリーニングを行った。

一連のスクリーニングによって選抜された株に対して、シーケンズ解析を行い、どの遺伝子にトランスポゾンミュータントが入っているかを確認した。

【結果・考察】

合計で 933 株のトランスポゾンミュータントをスクリーニングし、そのうち 7 株が選抜された。7 株全ての株は元々のレポーター株と比べて MV に対する応答(蛍光強度)が高かったことから、MV 伝達を抑制するような遺伝子に変異が入っていると考えられる。

今後はこれらの遺伝子のノックアウト株を作製し、MV に対する付着性やその特異性などを検証していく予定である。

【参考文献】

- Whiteley M. *et al.* (2017) Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* **551**: 313-320.
- Whitehead N.A. *et al.* (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 365-404.
- Pearson J.P. *et al.* (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**:1203-1210.
- Toyofuku M. *et al.* (2017) Membrane vesicle-mediated bacterial communication. *ISME J* **11**:1504-1509.