

細胞外膜小胞の受け渡しに関わる因子のスクリーニング系の検討

館内 稟太郎 (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)

【背景と目的】

多くの細菌は細胞膜に由来する直径 20~400 nm の膜小胞である membrane vesicle (MV) を産生し、環境中に放出する機構を持つことが明らかになっている。MV は主に脂質二重膜で構成される粒子であり、タンパク質や DNA、シグナル伝達物質などの細胞由来成分を内包している。MV はこれらの内包物を外部環境から保護し、周囲の細胞と融合などにより内容物を伝達することで細胞間での物質の輸送やコミュニケーション、遺伝子の水平伝播などの機能を発揮していると考えられている。MV の産生機構に関しては blebbing や explosive cell lysis (ECL) など幾つか知られているが、MV の受け取り機構に関しては詳しく分かっていない。

本研究は代表的なグラム陰性細菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) に着目し、MV 受け取り機構に関わる因子のスクリーニング系の確立を目的とするものである。緑膿菌は複数の MV 産生機構を持ち、異なる特性を持つ複数種の MV を産生するが、本研究ではその一つである ECL によって産生された MV に着目する。ECL は集団中の一部の細胞が溶菌を伴って破裂し、破裂した細胞膜の断片から MV が産生されるものである。

緑膿菌は日和見感染症を引き起こす細菌であるため、緑膿菌の MV 受け取り機構の解明は医学的に重要な意味を持つと考えられる。緑膿菌の MV の受け取り機構の解明は、緑膿菌にのみ抗生物質などを輸送するドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発や緑膿菌の MV の機能の妨害に関わる可能性がある。これにより、副作用が低く効果の大きい薬の開発にも貢献しうる。

また、ECL はホリンが細胞内膜に穴をあけ、エンドリシンがペプチドグリカン層を分解することで引き起こされるが、この二つの酵素はほとんどの細菌で保存されている。そのため、ECL によるベシクル産生はグラム陰性菌において普遍的な機構であると考えられている。本機構で産生される MV は別種の細菌によって産生されたものでも近い性質を持つ可能性があるのでは無いかと考えられる。そのため緑膿菌の MV の受け取り機構を解析することにより、グラム陰性細菌に共通する MV 受け取り機構の発見出来る可能性がある。

【方法】

本研究室における先行研究により、緑膿菌の ECL を誘導する事で培地成分を MV の内部に内包させる技術が確立された。そこで、本研究では、抗生物質を内包した MV を作製することで、MV 受け取り機構に関するスクリーニング系を検討した。トランスポゾンによるランダムな変異を導入した緑膿菌株の培養を抗生物質内包 MV の存在下で行う事により、抗生物質内包 MV に対する感受性に変化がある変異株を得られる。得られた株に対する 2 次スクリーニングとして、内包させた抗生物質に対する感受性に変化が無い株を選ぶことにより、MV 受け取り機構に異常のある株が得られると考えられる。

【結果および考察】

検討の結果、MV に抗生物質を内包させることに成功した。今後、今回検討したスクリーニング系を用いて得られた変異株を利用した研究を検討している。得られた株について、変異箇所をシーケンシングし、MV の受け取りに関連するタンパク質とそれをコードする遺伝子の特定を行い、特定した遺伝子が MV の受け取りにおいてどのような機能を担っているかを実験により明らかにすることにより、MV 受け取り機構全体の解明を目指す。ライブセルイメージングの手法を用いた当研究室の先行研究により、菌体に近接した MV がブラウン運動とは異なった運動をする事が観察されており、このことは MV と細胞を接着する機構と、融合する機構が別にある事を示唆しているのではないかと推測されている。この推測が正しければ MV の受け取りが正常に行えない株には、MV と接着に問題があるものと融合に問題があるものがあると思われる。複数種の変異株に対してライブセルイメージングによる解析を行う事によりこの仮説の検証を行うと同時に、他に MV の受け取りを説明する仮説が無いかを探ることにより、緑膿菌の ECL により産生された MV の受け取り機構を明らかに出来る可能性がある。

また、今後緑膿菌の MV 受け取り機構が他の多くの細菌に対して普遍性を持つどうか検討し、細菌種によらない普遍的な MV 受け取り機構の発見へと結びつけたい。同時に、MV 受け取り機構に種特異的な部分が無いかについても検討したい。先行研究により、MV の内部に抗生物質などの物質を内包させる手法が開発されているため、これらを明らかにすることができれば、特定の細菌のみに影響を与える DDS の開発などに繋がると考えられる。