

細胞外膜小胞を介した異種細菌間コミュニケーションが 細菌の二次代謝産物生産を誘導

～通常の細菌培養では生産されない未開拓な天然物の獲得に期待～

ポイント

- ・細菌が分泌する細胞外膜小胞が多様な種類の細菌に対して様々な化合物を生産誘導することを解明。
- ・細胞外膜小胞と化合物を介して、異種細菌が競争的に相互作用することが明らかに。
- ・通常の細菌培養では生産されない、未開拓な化合物の獲得に期待。

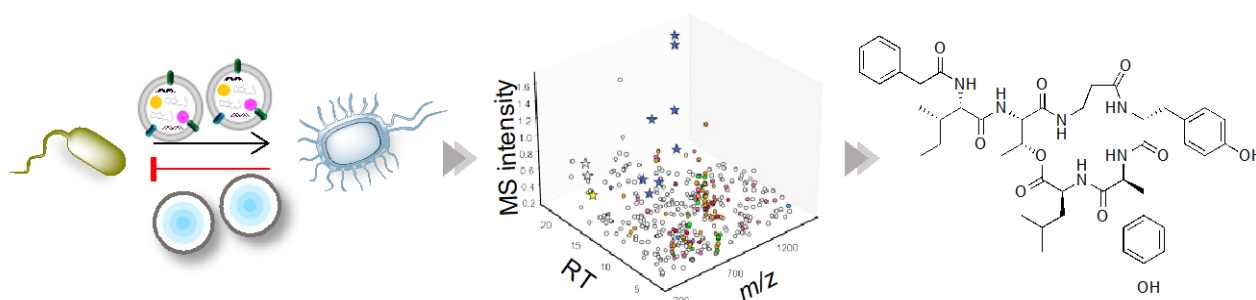
概要

北海道大学大学院薬学研究院の吉村 彩助教、脇本敏幸教授と、帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター及び同大学原虫病研究センターの菅沼啓輔助教の研究グループは、細胞外膜小胞 (MVs) ^{*1} を介した異種細菌間コミュニケーション^{*2} が、細菌の二次代謝産物^{*3} 生産を誘導することを明らかにしました。

細菌由来の二次代謝産物 (天然物) は細菌ゲノム上の生合成遺伝子を設計図として生合成されます。生合成遺伝子の 80% 以上は、研究室培養条件では発現しない休眠遺伝子^{*4} ですが、細菌の本来の生育環境では外部刺激に応じて発現すると考えられています。自然環境中で細菌が受ける刺激の一つとして異種細菌が放出する MVs が知られています。そこで研究グループは、MVs を用いて自然環境を模倣した条件で細菌を培養することで休眠遺伝子を活性化する方法を検討しました。

その結果、様々な細菌が MVs によって多様な天然物を生産誘導することを明らかにしました。さらに、2 種の細菌が MVs と天然物を利用して、競争的に相互作用することを示しました。今後は MVs と細菌の多様な組み合わせを本手法に適用することで、さらなる有用天然物の獲得が期待できます。

なお、本研究成果は 2023 年 7 月 14 日 (金) 公開の *Angewandte Chemie International Edition* 誌にオンライン掲載されました。



細胞外膜小胞によって生産誘導される新規天然物

【背景】

現在、臨床使用されている医薬品の半数近くは、植物や微生物が生産する二次代謝産物（天然物）と、その構造を一部改変した化合物です。微生物の体内では生合成遺伝子から作られる酵素が生体内小分子を原料に用いて天然物を生合成します。つまり、一つの微生物種が持つ生合成遺伝子の数から、その微生物が生産できる天然物の数を見積もることができます。解析の結果、細菌は研究グループが予想していた数よりも多くの天然物生合成遺伝子を保有することが明らかになりました。しかし、その80%以上は通常の研究室培養条件では発現していない休眠遺伝子でした。それら休眠遺伝子を活性化すれば未開拓な天然物を獲得できます。

研究室培養条件では発現しない休眠遺伝子ですが、環境中では様々な外部刺激を受けて活性化していると考えられます。環境中の外部刺激の一つに、細菌が放出する細胞外膜小胞（MVs）が知られています。MVsはほぼ全ての細菌が分泌する膜小胞で、タンパク質、DNA断片や小分子化合物を内包しています。最近、MVsは細菌間のコミュニケーション媒体として機能することが報告されました。これらの背景から、研究グループは細菌培養液にMVsを添加することで、休眠遺伝子を活性化し、新たな天然物の生産を誘導できる可能性に着目しました。

【研究手法】

まず、グラム陰性菌 *Burkholderia multivorans* から採取した MVs を添加して約 100 株の細菌を培養し、それら細菌が MVs 添加時にのみ生産する天然物を網羅的に探索しました。次に、見出した天然物を細菌培養液から単離し、化学構造を解析しました。さらに得られた天然物の生合成遺伝子を特定し、MVs 添加時にそれら生合成遺伝子が活性化されるメカニズムを調査しました。また、得られた天然物が MVs 生産菌 *B. multivorans* に与える影響を検証しました。

【研究成果】

B. multivorans 由来の MVs を添加及び非添加条件下で培養した約 100 株の細菌培養液から MVs 添加時にのみ生産される天然物を網羅的に探索しました。まず、細菌培養液抽出物を液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）によって測定し、膨大な質量分析データを得ました。得られたビックデータを MZmine2 と Python スクリプトによって網羅的に自動解析した結果、様々な種類の細菌が MVs 添加によって多様な代謝物を生産誘導していることが明らかになりました。

そのうち *Cryseobacterium* 属細菌 K35 株と放線菌 *Streptomyces eurocidicus* から一つずつ化合物を取得し、両化合物の化学構造を決定しました。また同様に、グラム陰性菌 *Xenorhabdus innexi* からは新規天然物 xeinamide A、B、xeidopeptide A–C と、過去に単離報告のある天然物 xenoamicin A、C、G を取得しました。結果、そのうち五つの化合物はアフリカ睡眠病の原因である *Trypanosoma b. rhodesiense* に対する強力な抗原虫活性を示しました。以上の結果から研究グループは、MVs を活用した休眠遺伝子活性化法を初めて確立し、これを MeVIUS（Membrane Vesicles Induced Unlocking System）と命名しました。

また、リアルタイムPCR解析から xeinamide 類、xeidopeptide 類と xenoamicin 類の生合成遺伝子は MVs 添加によって転写量が増加していました。網羅的な遺伝子発現解析（RNA-seq）の結果、クオラムセンシングに関わる遺伝子群の発現が MVs 添加時に低下していました。これまでに *X. innexi* の近縁種では、クオラムセンシングを抑制すると天然物の生産量が増加することが報告されています。このことから、MVs が *X. innexi* のクオラムセンシング*⁵を抑制することで天然物を生産誘導することが示唆されました。

研究グループは xeinamide 類、xidopeptide 類と xenoamicin 類の *B. multivorans* に対する活性を評価しましたが、いずれの化合物も *B. multivorans* の生育を阻害しませんでした。一方で、今回単離した xenoamicin 類が *X. innexi* の MVs に内包されていました。さらに興味深いことに、xenoamicin 類を含む *X. innexi* の MVs は、*B. multivorans* の生育を抑制しました。このことから xenoamicin 類は MVs によって運搬されることで、*B. multivorans* に対する静菌作用を示すことが明らかになりました。さながら、天然の DDS システムのようです。

以上の結果を統合し、研究グループは *B. multivorans* と *X. innexi* が MVs と天然物を介して競争的に相互作用することを明らかにしました。この相互作用メカニズムの解明により MeVIUS が細菌間コミュニケーションを模倣することで天然物生産を促していることを実証しました。

【今後への期待】

本研究で確立した MeVIUS は、MVs を細菌培養液に添加するだけの簡便な方法です。MVs は MVs 生産菌の培養液から採取できます。さらに、ほとんどの細菌は MVs 生産能力があり、細菌種ごとに MVs の性質が異なります。これらの利点を活かし、多様な MVs 生産菌と受容菌の組み合わせが可能です。さらに本手法を様々な評価系と組み合わせることで、望みの生物活性を有する未開拓な天然物の探索に利用することができます。

【謝辞】

本研究は文部科学省科学研究費補助金基盤 B (21H02635、22H05128)、若手研究 (20K16023、23K1436803)、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) ACT-X「環境とバイオテクノロジー (JPMJAX22BO)」、北海道大学国際連携研究教育局バイオサーフェス創薬グローバルステーション、武田科学振興財団、サントリー生命科学財団の支援を受けて行われました。

論文情報

論文名 Membrane-Vesicles-Mediated Interbacterial Communication Activates Silent Secondary Metabolite Production (細胞外膜小胞を介した異種細菌間コミュニケーションが二次代謝産物生産を活性化する)

著者名 吉村 彩¹、佐伯梨緒²、中田隆介²、冨本将汰²、城森啓宏^{2,3}、菅沼啓輔^{4,5}、脇本敏幸^{1,6}
(¹北海道大学大学院薬学研究院、²北海道大学大学院生命科学院、³琉球大学理学部、⁴帯広畜産大学原虫病研究センター、⁵帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター、⁶北海道大学国際連携研究教育局バイオサーフェス創薬グローバルステーション)

雑誌名 Angewandte Chemie International Edition (化学全般の専門誌)

DOI 10.1002/anie.202307304

公表日 2023年7月14日(金)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 教授 脇本敏幸(わきもととしゆき)

TEL 011-706-3239 FAX 011-706-3922 メール wakimoto@pharm.hokudai.ac.jp

URL <https://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/>

北海道大学大学院薬学研究院 助教 吉村 彩(よしむらあや)

TEL 011-706-3240 FAX 011-706-3922 メール ayay@pharm.hokudai.ac.jp

配信元

北海道大学社会共創部広報課(〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

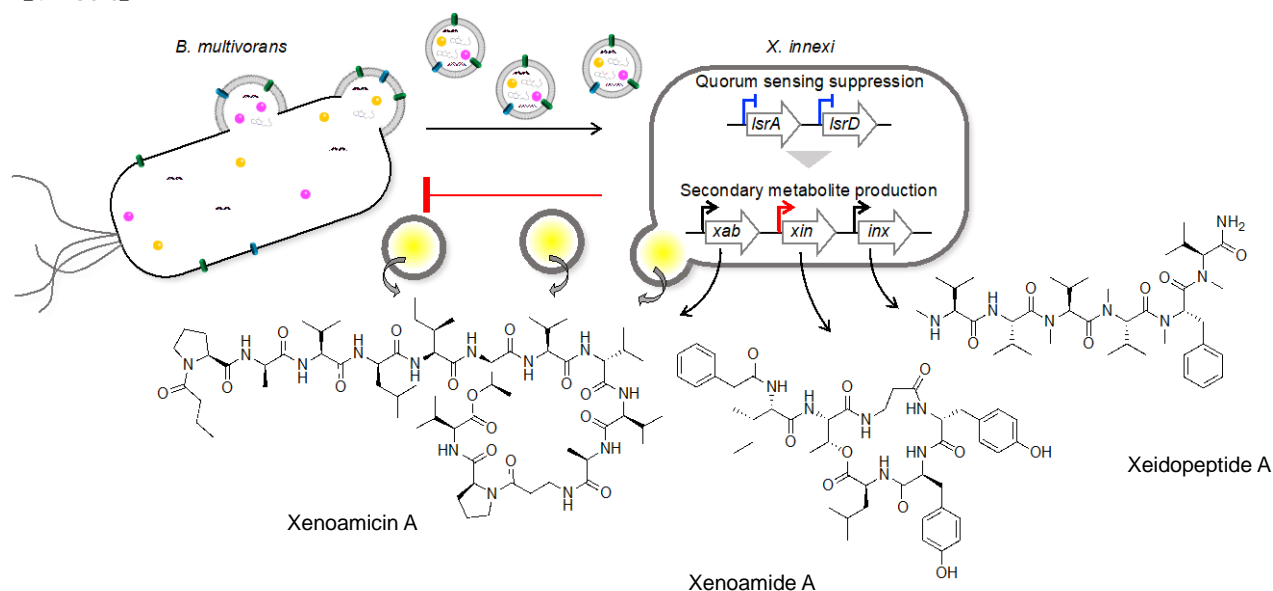


図 1. 本研究から明らかになった異種細菌間コミュニケーションの概念図。 *B. multivorans* 由来の MVs が *X. innexi* に作用して、 *X. innexi* の二次代謝産物の生産を亢進する (上段)。 *X. innexi* は自身の二次代謝産物を内包した MVs を放出する (下段)。 *X. innexi* から放出された MVs が *B. multivorans* に対して静菌作用を示す。

【用語解説】

- *1 細胞外膜小胞 … 細菌が放出する膜小胞の総称で、メンブレンベシクル (membrane vesicles、MVs) と呼ばれる。ほとんどの細菌が MVs 生産能を有しているが、細菌種や細菌の生育フェーズごとに MVs の内容物やサイズが異なる。MVs に共通した特徴として直径 20-400 nm の小胞で、タンパク質・DNA 断片や小分子化合物を内包する。これまでに MVs は遺伝子の水平伝播や、バクテリオファージの感染を防ぐデコイ、栄養獲得や細菌間相互作用に寄与することが知られている。最近ではワクチンアジュバンドや薬剤送達の担体としての応用が盛んに研究されている。

- *2 細菌間コミュニケーション … 細菌同士が接触もしくは何らかの物質をやり取りすることで相互作用する現象。地球上には約 1030 個の細菌が棲息しており、それらの多くは同種・異種細菌からなるコミュニティを形成している。細菌同士の相互作用が細菌コミュニティの構成菌種や各細菌種の割合を決定している。実際に人体内にも多くの細菌が存在しており、その細菌叢バランスが崩壊することで疾患を引き起こされることが明らかになりつつある。現在、細菌ゲノム解読技術の発展によりそれぞれの細菌コミュニティの構成細菌を決定することが容易になってきたが、どの細菌がどのようにコミュニケーションするかはほとんど明らかになっていない。今後、細菌間コミュニケーション様式が明らかになることで新たな疾患治療戦略が生まれることが期待される。

- *3 二次代謝産物 … 異なる生物種に共通する代謝産物である一次代謝産物に対して、生物種に固有の代謝産物を二次代謝産物と呼ぶ。

- *4 休眠遺伝子 … 通常の細菌培養条件では発現していない天然物生産を担う遺伝子。全ての天然物合成遺伝子の 80%以上が休眠遺伝子に該当する。従来は栄養豊富な培地で生育させた単一の細菌が生産する天然物が生物活性や物理化学的性質を指標に単離されてきた。このような従来法では休眠遺伝子由来の天然物を獲得することは困難である。一方で、遺伝子操作や細菌に人工的な刺激を与えることで生産誘導された休眠遺伝子由来の新規天然物が複数報告されている。休眠遺伝子は依然として未開拓な天然物の探索源として注目を集めている。

- *5 クオラムセンシング … 同種の細菌が自己誘導因子を授受し合い、周囲の菌密度を感知する現象。菌密度に応じて遺伝子発現や表現型を制御することで細菌集団としての振る舞いを決定する。一般に自己誘導因子は小分子化合物で、細菌種ごとに利用する自己誘導因子の化学構造が異なる。