

細菌による細胞外膜小胞への選択的タンパク質輸送機構の解析

Analysis of the selective protein loading to bacterial extracellular membrane vesicles

京都大学 化学研究所 川本 純

研究成果概要

本研究では、京都大学化学研究所スーパーコンピュータシステムを利用し、細菌が放出するナノサイズのカプセル状細胞外微粒子 (Membrane Vesicles, MV) の生産機構の解析に取り組んだ。特に、我々がマアジの腸内より採取した低温適応性細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 の MV 産生に関連する遺伝子群の同定と生理機能解明を試みた。本菌は近縁の *Shewanella* 属細菌と比較して、顕著に MV を高生産する。さらに、本菌の MV には機能未知タンパク質 P49 をほぼ単一の積荷タンパク質として輸送する。P49 をコードする遺伝子 *hm3347* は細菌の II 型タンパク質輸送装置のサブユニット遺伝子と莢膜多糖合成関連遺伝子、および機能未知遺伝子群からなる遺伝子クラスターに存在した。P49 遺伝子クラスターに存在する機能未知遺伝子 *hm3362* と *hm3361* は、AlphaFold2 をもちいた構造予測から、細菌の莢膜多糖の初発反応を触媒する酵素 undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase (WecA) の N 末端および C 末端領域をそれぞれコードすることがわかった (WecA3)。さらに、本菌のゲノムから WecA をコードする遺伝子が、さらに 2 種 (*wecA1* と *wecA2*) を見いだした。これらの遺伝子の単独破壊株、二重欠損株、全ての *wecA* 遺伝子を欠く三重欠損株を作製し、それぞれの莢膜多糖合成能、および MV 生産特性への影響解析した。その結果、三重欠損株でのみ細胞と MV を覆う莢膜多糖が消失しており、一つ以上の *wecA* 遺伝子を有する場合、野生株と同様の莢膜多糖を合成していた。一方で、MV 生産性は *wecA* 遺伝子を 1 つでも欠損すると野生株の 20% 程度まで低下し、三重欠損株で最も顕著に MV 生産性が低下し、その生産性は野生株の 10% 以下であった。三重欠損株について、より詳細に解析した結果、本変異株は野生株と同様に増殖する一方で、電子顕微鏡観察から細胞表層に親株には存在しない異常な膜構造が発達していた。本菌の超薄切片を作製し、細胞表層の微細構造を可視化した結果、三重欠損株から外膜がバルーン状に発達した構造が観察された。この異常な膜構造は、いずれかの *wecA* 遺伝子を相補することで消失した。本結果は、莢膜多糖の欠損は、本菌の MV 形成プロセスの膜の切り出しに関与している可能性を示しており、本菌の MV 生産は細胞表層成分である莢膜多糖によって制御されている新規の MV 生産機構を本菌は有していることを示している。以上の成果は、本菌の MV 生産を活用した物質生産システムや、薬物送達・ワクチン開発に必須の基盤技術である MV の生産性制御および表層エンジニアリングシステムの構築に貢献する仕組みの確立につながると期待される。