

# 細菌が放出するナノサイズの細胞外膜小胞を視る

菊池 洋輔・田岡 東\*

## はじめに

細菌は、一見すると、それぞれが個別に活動する単細胞の単純な生物と捉えられがちであるが、多細胞生物とは異なった方法で集団を形成し、“賢い”生存戦略を取っている。近年、細菌が環境中に放出するメンブレンベシクル(MV)と呼ばれる小さな袋状の膜小胞が、その細菌の集団生活の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。細菌が放出するMVの多様な役割が明らかになるにつれて、その分子機構を理解するためにMVの分子レベルの実態を解明する必要性が高まっている。また、細菌への物質輸送を可能にするMVの特性は、ワクチンやドラッグデリバリーなどの応用研究の分野でも注目されている。その一方で、MV粒子一つひとつの性質や、ナノメートルサイズのMVがどのように機能を果たすのかを調べる方法は限られている。本稿ではMVの実態を明らかにするための高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を用いた新たな研究手法とそこから得られた最新の研究成果を紹介する。

## 細菌が産出するメンブレンベシクルの役割

MVとは、細菌が放出する直径20から400 nm程度の細胞外膜小胞であり、主にリン脂質膜、膜タンパク質などで構成された小胞と、小胞内部に含有される遺伝物質(DNAやRNA)や細胞質由来のタンパク質、シグナル分子などからなる<sup>1,2)</sup>。細菌が細胞外に小胞を放出することが報告されたのは、50年以上前で、電子顕微鏡観察によって細胞外膜小胞が確認されている<sup>3)</sup>。その後、グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌によるMV生産が報告され、現在ではMVの放出は多くの細菌で保存された現象であると考えられている。細胞外に放出されたMVは、細胞の生存戦略において、さまざまな役割を持つ。たとえば、バイオフィルムを構成するための細胞外マトリックスの提供や、細菌を標的とする抗生物質やウイルスから細菌自身を防御するための囹としての役割、さらに、遺伝子の水平伝搬、毒素の運搬、細胞間コミュニケーションなどで細胞から細胞へ渡される物質の運び手としても働く<sup>1,2)</sup>。MVを介した物質の輸送には以下のような利点がある。溶液中では拡散性が低い疎水性物

質を効率的に運搬できる。また、内容物の濃度を維持したまま輸送ができ、加えて、細胞外環境中で受けるストレスから運搬物を保護する働きもある。興味深いことに、MVはクオラムセンシングと呼ばれる細胞間コミュニケーションのための化学物質の輸送を担っているが、1個のMV粒子には、1個の細胞の遺伝子発現を誘導できる十分な量の情報伝達物質が含まれている<sup>4)</sup>。さらに、MVによる輸送には細胞選択性があり、細菌種特異的な物質輸送が行われることが示唆されている<sup>5,6)</sup>。つまり、細菌が放出するMVは効率的に情報伝達を行うことのできるメッセンジャーであるといえ、それ故に情報伝達に関わるMVの特性を調べることは、細菌集団制御の分子メカニズムの理解につながる。

これまでの研究でのMVのキャラクタライゼーションは、質量分析による化学組成分析や、密度勾配遠心分離法による密度測定、ゼータ電位測定によるMV表面電荷測定が行われており、MVを構成するタンパク質、脂質などの組成や、MVの表面電荷、密度などの物理化学的特性のバルク解析が行われてきた。一方、MV1粒子をターゲットとして物理化学的特性を調べた研究は報告されていない。小さく壊れやすいMVの1粒子解析を行うためには、生体試料を低侵襲的に、かつ高分解能で観察できる顕微鏡技術が必要である。

## 高速原子間力顕微鏡とは

原子間力顕微鏡(AFM)は、走査型プローブ顕微鏡の一種で、試料とプローブ(探針)の間に働く力を検出することで、画像を得る顕微鏡である<sup>7)</sup>。走査型プローブ顕微鏡は、基板上に固定された試料の表面をプローブが水平方向に走査することでイメージングを行う。AFMのプローブは、カンチレバー(Cantilever:片持ち梁の意味)の先端に付いた先端半径約5 nmの尖った針であり、このプローブが試料表面に接触した時のカンチレバーのたわみから、プローブ-試料間の原子間力の検出を行う(図1A)。この原子間力はあらゆる物質とプローブ間に働くため、AFM観察ではあらかじめ試料の表面処理をする必要がない。また、常温常圧の液体中での測定ができることから、AFMはタンパク質や核酸、細胞などの生体試料を、凍結、乾燥、染色など試料にダメージを与

える操作を行うことなく、ネイティブな状態の試料の表面構造を高い分解能で観察できる。特に高速AFMは、緩衝液や培養液中などの生理的条件下で柔らかい生体分子の構造とその動態を可視化することに特化した顕微鏡で、金沢大学ナノ生命科学研究所 (NanoLSI) の安藤教授の研究グループによって開発された<sup>8)</sup>。彼らは、生体分子の構造動態を捉えるための画像取得速度の飛躍的な向上と生体分子への低侵襲性を、高感度で低いばね定数を持つカンチレバーの開発、シグナル検出速度や装置全体の制御速度の向上により解決した。その結果、高い空間分解能 (水平方向で2~3 nm, 鉛直方向で約0.1 nm) と現状の構成部品でほぼ理論限界である50 msec/frameのイメージング速度での観察が可能な高速AFMが開発された<sup>8-10)</sup>。高速AFMでの観察中に試料に与える力は、最大でも100 pN (ピコニュートン) であり、柔らかい生体試料を破壊することなく観察できる。私たちはこの高速AFMを用いて、緩衝液中の生きた細菌細胞 (図1B) や細菌培養液から単離したMV (図1C) の観察を行った。AFM画像では、試料表面の凹凸を色調で表している。図1では黒色に近いほど高さが低い場所で、白色に近いほど高い場所を示す。これまでに、私たちは高速AFMを用いて生きた細菌細胞のナノメートルサイズの表面構造の観察に成功している<sup>11,12)</sup>。また、高速AFMにより

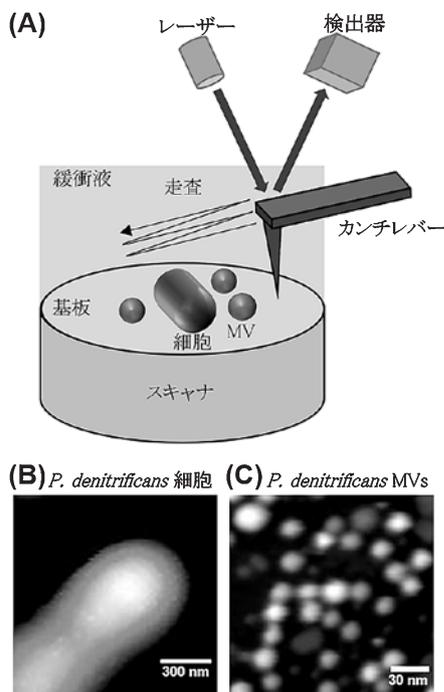


図1. 高速原子間力顕微鏡観察 (高速AFM)。 (A) 高速AFMの模式図。 (B) 緩衝液中で観察した *Paracoccus denitrificans* 細胞のAFM像 (形状像)。 (C) *P. denitrificans* の培養液から単離したMVのAFM像 (形状像)。

直径が100 nm以下の小さなMVを溶液中で壊すことなく観察できた。

### 位相モードによる物性イメージング

AFMには、プローブと試料間に働く力の変化から、試料表面の物理的性質や化学組成分布を可視化するいくつかの測定モードがある<sup>13)</sup>。位相モードはその一つで、共振周波数付近の励起信号によって振動するカンチレバーが、試料に接触した時の振動の変化を検出し、励起信号に対する位相差 (位相の遅れ) を測定し (図2A)、この位相差の情報を画像化する<sup>14)</sup>。位相差は試料表面の吸着性や、粘弾性などの物理的特性の違いに依存するため、試料表面のこれらの物性の分布をイメージングできる (図2B)。すなわち、ナノメートルサイズの微小な構造の表面の吸着性や硬さを画像上にマッピングして調べることができる。位相モードは、主に表面科学や材料サイエンスの分野で、表面組成に不均一性がある試料の解析に用いられている<sup>15,16)</sup>。本研究では、これを生体試料の観察に応用した。位相差の値に大きな影響を与える物性の種類は、測定条件によって異なる。本研究で用いた観察条件で、液体中の試料表面を観察した時に生じる位相差の主な原因は、プローブと試料表面の間の吸着力である<sup>17)</sup>。この吸着性の違いは、試料を構成する物

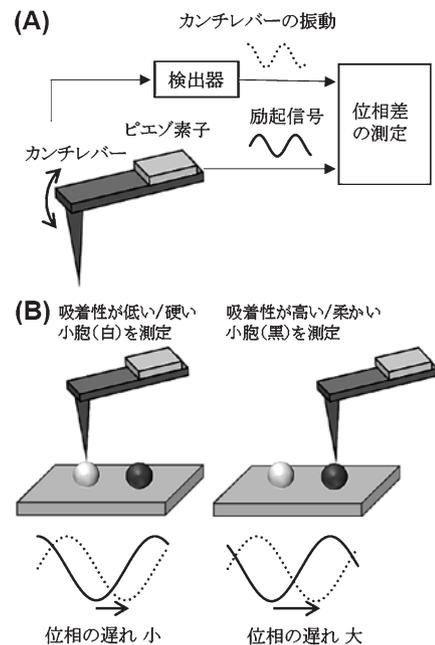


図2. 原子間力顕微鏡の位相モード。 (A) 位相差の値の検出方法の模式図。 (B) 物性の差が異なる2種類の小胞を測定したときの位相差の値 (位相の遅れ) への影響。プローブとの相互作用が強い小胞 (すなわち、吸着性が高いまたは柔らかい小胞) ほど位相差の値が大きくなる。

質の化学組成の違いによって生じるので、高速AFMの位相像では試料表面の組成分布やその違いを調べることができる。

### メンブレンベシクル1粒子の物性を調べる

私たちは、高速AFMの位相モードを用いて、溶液中のMV1粒子の物性を定量的に解析した<sup>18)</sup>。 *Paracoccus denitrificans* の培養液から単離したMVをマイカ基板上に固定しPBS緩衝液中でAFM観察した。図3に、位相像と形状像、およびそれらのマージ像を示した。位相像の色調の違いは物性の違いを示しており、位相像において個々のMV粒子の色調が異なっていることに注目して欲しい。マージ像では、赤っぽいMV粒子は吸着性/粘

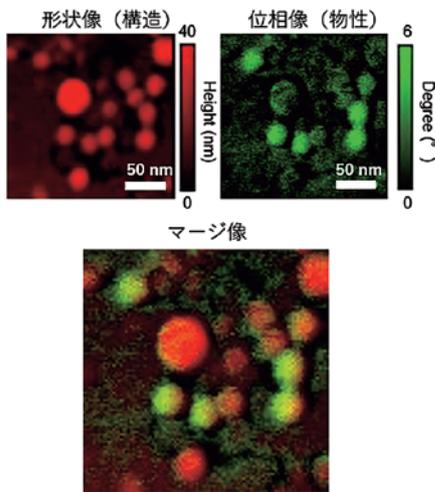


図3. 高速AFM位相モードによるMVの物性イメージング。形状像は試料の構造を、位相像は試料の物性を表わしている。マージ像の色調の違いは個々のMVの物性多様性を示している。

弾性が低いことを、緑っぽいMV粒子は吸着性/粘弾性が高いことを表している。この結果は、同じ種の細菌が培養液中にさまざまな性質のMVを放出することを示しており、細菌が放出するMVの不均一性を初めて実証した。次に、私たちは、位相像からMV1粒子の物性を定量的に解析する手法を開発した<sup>18)</sup>。MVを観察する際に、試料中に内部標準物としてポリスチレン製の微小なビーズを混ぜておき、このビーズとマイカ表面の位相差の値を基準値として、一つひとつのMVの位相差の値を定量的に表した。これにより、試料間のMVの物性値やその分布の比較が可能になった。そこで、3種のグラム陰性細菌（大腸菌、緑膿菌、*P. denitrificans*）と1種のグラム陽性細菌（枯草菌）が放出したMVの物性を調べて比較したところ、調べたすべての細菌が物性の異なる不均一なMVを産生すること、それぞれの細菌が産生するMVの物性分布には種間での違いがあり、MVに種特異的な物性があることが明らかになった<sup>18)</sup>。詳細なMVの物性分布は4種の細菌とも異なるが、全体的な特徴として大腸菌と*P. denitrificans*が産生したMVは、他の2種の細菌と比較して接着性に富むことが分かった<sup>18)</sup>。

近年では、細菌の放出するMVに多岐にわたる機能があること<sup>1,2)</sup>、さらに、MVを放出する仕組みに複数の経路があることが明らかになったことから<sup>19)</sup>、MVそのものの性質にも多様性があると考えられている<sup>20)</sup>。これを実証するため、MVの性質を生理的環境に近い溶液中でナノメートルレベルの分解能で解析できる新しい手法の開発が必要であった。本研究の結果、細菌が物性の異なる複数のタイプのMVを放出することを初めて実験的に確かめることができた。MV1粒子の物性解析は、MV

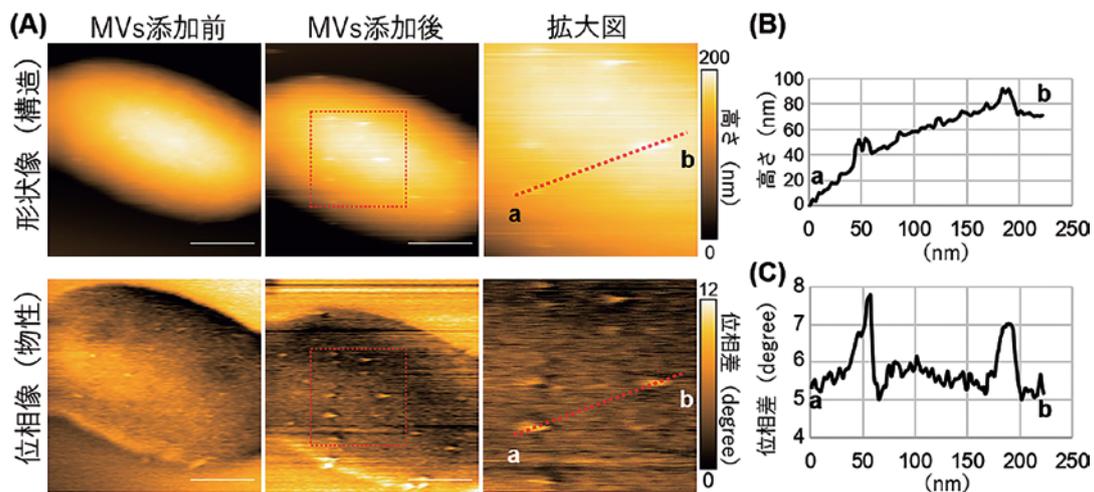


図4. 高速AFM生細胞イメージングを用いたMV結合過程の観察。(A) *P. denitrificans*細胞をマイカ表面に固定し、観察溶液にMVを添加する前と、添加して約20分後の同じ細胞の形状像と位相像を示した。(B) パネルA形状像のab間の高さのラインプロファイル。(C) パネルA位相像のab間の位相差値のラインプロファイル。

が多様な機能を発揮するメカニズムを解明するための有用な情報を提供することが期待される。

### 細菌表面へのメンブレンベシクルの結合過程を視る

宿主の細胞から放出されたMVは、環境中を漂い、最終的には標的細胞に付着し融合することで内包する物質の輸送を行うと考えられている。しかしながら、実際にMV粒子が標的細胞へ結合する過程を観察した報告はない。そこで、私たちは、高速AFMを用いた生細胞イメージング<sup>11,12)</sup>と位相イメージングを組み合わせ、生きた細胞の表面にMVが吸着する様子を観察した。まず、*P. denitrificans*細胞をポリ-L-リジンで処理したマイカ基板上にのせ、緩衝液中で細胞表面を観察する。その後、観察チャンバー内に単離したMVを添加し、細胞表面の構造変化を形状像と位相像で観察した(図4)。MV添加前、形状像では細胞の表面は滑らかで、位相像では少数の粒子状の構造(外膜上のタンパク質と考えられるが構成成分は不明)が見られた(図4A)。MV添加後、同じ細胞を観察したところ、形状像と位相像で明確に細胞表面に粒子状の構造が増加していることが確認できた(図4B)。これらの粒子状構造の高さは10~30 nmで、添加したMV試料の高さ分布と一致した。さらに、位相像では高いコントラストで粒子状構造が観察されており、MVと細胞表面に物性の違いがあることが分かった(図4C)。現在は、高速AFMによる生細胞位相イメージングによる細胞表面へのMV融合過程とMVによる物質輸送機構の直接観察に挑んでいる。

### おわりに

本稿では、試料の物性の違いを検出するAFM位相イメージングを利用した、MVの1粒子物性解析や、MV結合の生細胞イメージングの結果について紹介した。細胞間相互作用と密接に関わるMVの特性を分子レベルで研究することは、細菌集団の制御メカニズムの分子基盤を理解するために必要である。また、ここで紹介した手法は、細菌が放出したMVだけでなく、真核生物が産生する細胞外小胞(エキソソームやアポトーシス小胞、マ

イクロベシクル)、またウイルス粒子などの光学顕微鏡での観察が困難な大きさで、もろい粒子状の構造物の観察にも応用できる。細胞外膜小胞の放出は細菌だけでなく、アーキア<sup>21)</sup>、真核生物<sup>22)</sup>などのすべてのドメインで保存されており、本手法の多様な細胞外膜小胞をターゲットとした研究への応用が期待できる。

### 謝 辞

本研究は、科学技術振興機構(JST)の戦略的創造研究推進事業ERATO「野村集団微生物制御プロジェクト」(JPMJER1502, 研究総括:野村暢彦)および文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム(WPI-NanoLSI)の支援を受けて実施されました。また、筑波大学の野村暢彦教授はじめ野村集団微生物制御プロジェクトの共同研究者の皆様、金沢大学の安藤敏夫特任教授、古寺哲幸教授に対し、心から感謝を申し上げます。

### 文 献

- 1) Toyofuku, M. *et al.*: *Adv. Colloid Interface Sci.*, **226**, 65 (2015).
- 2) Schwegheimer, C. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 605 (2015).
- 3) Bladen, H. A. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **86**, 1339 (1963).
- 4) Toyofuku, M. *et al.*: *ISME J.*, **11**, 1504 (2017).
- 5) Tashiro, Y. *et al.*: *Front. Microbiol.*, **8**, 571 (2017).
- 6) 森永花菜ら: *生物工学*, **96**, 451 (2018).
- 7) Binnig, G. *et al.*: *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930 (1986).
- 8) Ando, T. *et al.*: *Prog. Surf. Sci.*, **83**, 337 (2008).
- 9) Uchihashi, T. *Nat. Protoc.*, **7**, 1193 (2012).
- 10) 安藤敏夫: *1分子生物学*(原田慶恵, 石渡信一 編), p. 239, 化学同人(2014).
- 11) 田岡 東ら: *化学と生物*, **53**, 293 (2015).
- 12) Yamashita, H. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **422**, 300 (2012).
- 13) Dufrêne, Y. F. *et al.*: *Nat. Nanotechnol.*, **12**, 295 (2017).
- 14) Garcá, R. *et al.*: *Nat. Mater.*, **6**, 405 (2007).
- 15) Magonov, S. N. *et al.*: *Surf. Sci.*, **375**, L385 (1997).
- 16) Connell S. D. *et al.*: *Mol. Membr. Biol.*, **23**, 17 (2006).
- 17) Uchihashi, T. and Ando, T.: *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 213112 (2006).
- 18) Kikuchi, Y. *et al.*: *Nanoscale*, **12**, 7950 (2020).
- 19) Turnbull, L. *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 11220 (2017).
- 20) Toyofuku, M. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 12 (2019).
- 21) Ellen, A. F. *et al.*: *Archaea*, **2010**, 608243 (2010).
- 22) Théry, C. *et al.*: *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 569 (2002).