総 説

グラム陽性細菌が能動的につくるメンブランベシクルの 機能と生合成

尾花 望、野村 暢彦*

筑波大学 生命環境系

メンブランベシクル (membrane vesicle: MV) は 20 – 500 nm の球状構造体であり、様々な細菌が産生する。MV は核酸、タンパク質、細胞壁成分、シグナル物質を含み、これらの“運び屋”として機能すると考えられており、細菌間相互作用のみならず宿主細胞への毒素の輸送や宿主細胞の免疫調節といった細菌-宿主間相互作用にも関与することが示されている。これまでの MV 研究は主にグラム陰性細菌において進められており、厚く固い細胞壁を有するグラム陽性細菌においてはあまり着目されていなかった。しかしながら、近年グラム陽性細菌における MV の報告が蓄積されつつあり、MV 産生は細菌において普遍的かつ不可欠な機能であると推測される。さらには MV が死細胞から生じるただの破片ではなく、細菌が能動的に産生している構造体であることも示されている。本総説では主にグラム陽性細菌が産生する MV の機能やその生合成機構について近年の研究進展を紹介する。

Key words : membrane vesicle, cell to cell interaction, immunomodulatory factor, virulence factor, transporter

はじめに

みなさんは細菌が産生するメンブランベシクル (membrane vesicle、以下 MV) をご存じだろうか。MV とは脂質二重膜から構成される小胞のことを指し、20–500 nm の球状の構造体であり、様々な細菌が放出する¹⁾。MV は DNA や RNA といった核酸やタンパク質を含み、また、生体膜由来であることから、膜タンパク質やリポ多糖 (LPS)、ペプチドグリカン (PG) といった細菌の最外層構造も含有する。MV はこのように多様な構成成分の「運び屋」として機能しており、細菌の病原性や耐性そして生物間相互作用に寄与すると考えられている。MV に関する報告はこの 10 年足らずで大きく増加しており、ホットなトピックとなりつつある²⁾。また海洋や活性汚泥といった自然環境中からも MV の単離報告があり、MV 産生は実環境中でも実際に起こり得る現象であることが示されて

いる³⁾。これまでの MV 研究はグラム陰性菌で多くなされてきており、グラム陰性菌が産生する MV はその構成膜が外膜であることから「outer membrane vesicle」と記述されることが多い。他にも MV は「extracellular vesicle」や「microvesicle」と呼ばれる場合があり、研究者間でその呼称は統一されておらず様々であるが、本稿では最も使用頻度の高い MV を使用することとする。MV は細胞から出芽するように出現し、細胞外に放出されると考えられてきたことから、細胞の最外層に厚く堅い細胞壁を有するグラム陽性菌では MV を産生しないと考えられてきた。しかしながら、現在ではグラム陰性菌のみならず、グラム陽性菌や菌類でも MV 産生の報告が続いており、つまり、MV 産生は微生物において普遍的な現象であると考えられる (図 1)⁴⁾。本稿では近年明らかになりつつあるグラム陽性細菌における MV の機能や生合成について主に紹介する。

メンブランベシクルの解析方法

MV の解析をするためにはまず MV を精製し、単離する必要がある。本項では多くの研究者の馴染みが薄いと思

*To whom correspondence should be addressed.
Phone : +81-029-853-6627
Fax : +81-029-853-6627
E-mail : nomura.nobuhiko.ge @ u.tsukuba.ac.jp

われる MV について、その精製方法や解析方法を紹介する。一般的に MV は菌体より放出されるため、液体培養の場合は培養上清に含まれる。培養した菌体を遠心分離によって取り除き、培養上清をメンブレンフィルターによって無菌化する。フィルターは低タンパク質吸着材質で構成された 0.22 もしくは 0.45 μm 孔径のものを用いることが多い。固形培地中における MV 産生を解析する場合には、固形培地上のコロニーをバッファー中に懸濁したものを上記の液体培養液の代替として用いる。培養液上清中には MV の他に可溶性の分泌タンパク質や代謝産物等が含まれる。そこで培養上清を超遠心し、MV を沈殿させ単離する方法が一般的に広く用いられている。MV 生産量が少ない生物種からの MV の単離や、MV を大量に必要とする場合には、培養液上清を 100-200 kDa カットオフフィルターで濃縮し、その後濃縮液を超遠心に用いることによって MV を単離する方法もとられている。サンプル間での MV 生産量を比較、解析する目的では、超遠心による単離で十分の場合が多いが、超遠心の沈殿には MV のみならず、鞭毛や線毛といった巨大な構造物が残存したままである。そこで細胞への添加実験など MV の生理活性を解析する場合には、スクロースや iodixanol を用いた密度勾配遠心法によって MV をさらに精製する必要がある。これらの方法を用いることによってバイオフィilmや海洋といった実環境中サンプルからも MV を精製することが可能である^{3,5)}。近年、MV 粗精製試料から簡易且つ高度に MV を精製する方法としてエポキシ基によって修飾されたビーズを用いる方法が開発された⁶⁾。現在のところ、この方法は *Porphyromonas gingivalis* の MV に限定されている。しかし、他の微生物の MV に含まれる構成成分の解析が進み、また、ビーズ修飾基を各生物の MV に適切なものに変えることによって、他の微生物の MV の精製にも応用可能であると考えられる。近年では MV 解析の第一歩として精製した MV を用いたタンパク質のプロテオ-

ム解析や DNA や RNA といった核酸の次世代シーケンサーによる網羅的解析が行われることが多い^{7,8)}。

単離された MV の定量にはタンパク質が指標に用いられることが多く、現在最も一般的な方法である。しかし、タンパク質全体を定量するブラッドフォードや BCA 法などでは MV に含まれるタンパク質以外も定量することとなり、完全な MV 定量方法とは言い難い。MV が含有する膜タンパク質や LPS などをウェスタン解析などによって特異的に定量する方法も MV 定量法として挙げられる。また、FM4-64 などの脂質特異的な蛍光色素を用いた蛍光測定法は簡便且つ定量性を有しており、MV の定量法としては利便性の高い定量方法である。遊離した蛍光色素は蛍光を発しない一方、MV を構成する脂質の存在に応じて蛍光を発するため、粗精製の MV を定量する方法としても使用可能である。近年、動的散乱光を計測することによる MV の粒径の算出や、ナノ粒子トラッキングシステムによる MV の粒子数の測定が MV の定性、定量方法として報告例が増加している (図 1C)⁹⁾。様々な MV 定量法が存在する一方、ほとんどの MV の定量法は MV の構成成分を定量しているに過ぎないため、「MV が確かに存在する」ことを言及するには顕微鏡による観察が必須であるのが現状である。MV の視認には透過型及び走査型電子顕微鏡 (EM) を用いる (図 1A および B)。EM による MV の観察においては必ずしも MV の精製を必要とせず、菌体と同時に撮影することが可能である一方、精製した MV を透過型 EM で観察することによって対象の微生物が MV を産生していると記述する例が多い (図 1B)。近年では原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた MV 観察も報告されており、高速 AFM を用いたライブイメージングへの応用が期待されている¹⁰⁾。さらには超解像顕微鏡を用いて MV 産生のライブイメージングに成功した例も報告されている⁸⁾。

図 1. グラム陽性細菌が産生する MV

グラム陽性偏性嫌気性細菌ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) が産生する MV。

A. SEM による MV 生産の観察。Bar=1 μm 。

B. TEM による精製 MV の観察。Bar=200 nm。

C. ナノ粒子トラッキング技術による MV の粒径および濃度の解析。

メンブランベシクルの機能

MV は様々な物質の“運び屋”としての機能を有しており、病原因子、付着因子、DNA、RNA、細胞間コミュニケーションシグナル物質そして免疫調節因子を含んでいる。つまり、MV は細胞障害性、宿主細胞への侵入、バイオフィーム形成、遺伝子の水平伝播、細胞間コミュニケーションおよび抗生物質耐性に関与する。前述のように近年ではグラム陽性細菌でも細胞壁成分、核酸、病原因子を含む MV 産生の報告が相次いでおり、グラム陽性細菌においても MV は様々な機能を有することが明らかとなった (図 2)。

グラム陽性菌では 2009 年に黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) において MV のプロテオーム解析が行われ、MV には細胞外タンパク質や細胞質タンパク質が含まれており、さらに複数の病原因子を含むことが明らかとなった¹¹⁾。黄色ブドウ球菌の MV は β -ラクタマーゼを含み、アンピシリン感受性のグラム陰性菌およびグラム陽性菌に抗生物質耐性に付与することから、薬剤耐性のまん延に関与すると予想される¹²⁾。これまでグラム陽性菌で報告されている MV の多くは病原因子を含み、MV 産生者である微生物の病原性と深く関連があることが示唆されている。さらにある種の黄色ブドウ球菌の MV は α 毒素を含み、この MV が宿主細胞へ接着して毒素を送り込むことによって細胞死を誘導する (図 3)¹⁰⁾。炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) が産生する炭疽毒素 (致死因子 (LF)、浮腫因子 (EF) および防御抗原 (PA)) は MV の精製画分から検出される一方、MV を取り除いた培養上清から毒素はほとんど検出されない。このことは細胞外に分泌される炭疽毒素の大半は MV によってパッケージされ、宿主細胞に運搬されると考えられる¹³⁾。また *Listeria*

monocytogenes の MV は細胞侵入や宿主免疫からの回避に重要な病原因子である InlB や listeriolysin (LLO) を含み、*Streptococcus pneumoniae* の MV は細胞溶解毒素である pneumolysin (Ply) を含んでいる。Ply はそのアミノ酸配列上に細胞外分泌シグナル配列を有していないにも関わらず細胞外に分泌されており、多くの微生物においても分泌シグナル配列を持たないタンパク質が細胞外から検出されることが知られている¹⁴⁾。これらのタンパク質は MV 産生に伴って MV 中にロードされることによって細胞外へ分泌されている可能性がある。どのような機構で特異的なタンパク質が MV にロードされるのかは不明であるが、MV は細胞質タンパク質を細胞外に特異的に分泌する機構としても見ることもできる。

グラム陰性菌の MV は LPS や PG を含み、宿主免疫を調節する活性を有している¹⁵⁾。グラム陽性菌の MV もまたリポタンパク質や PG といった細胞壁成分や病原因子を含むことから、免疫原性を有しており、細菌の急性感染や慢性感染に深く関与すると予想されている (図 3)。実際に結核菌 (*Mycobacteria tuberculosis*) の MV 中にはリポタンパク質である LpqH、LppX、LprA が濃縮されている¹⁶⁾。これらのタンパク質は Toll 用受容体 (TLR) 2 のリガンドとしてはたらき、樹状細胞やマクロファージにおける抗原提示を阻害することが知られている¹⁷⁾。結核菌の MV をマウスに投与したのち、結核菌に感染させると肺や腎臓への細菌の移行が促進されることが示されている。我々は腸内常在細菌であり食中毒細菌でもあるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) がタンパク質や DNA、PG を含む平均 160 nm 径 (最頻値 100 nm 径) の MV を産生することを見出しており (図 1)、さらにその MV が TLR2 シグナリング経路を介して宿主細胞の自然免疫を誘導することが示唆された (図 3、未発表データ)^{6, 18)}。つ

図 2. グラム陽性細菌における MV 産生とその構成成分

グラム陽性菌は厚く固い細胞壁を有するが、細胞壁が修飾や薄くなった場合、あるいは細胞壁に pore が生じた場合 MV が産生されると予測されている。産生された MV は細胞質成分を含む様々な物質によって構成される。

図 3. グラム陽性細菌における MV の機能

MV の構成成分である DNA は *Streptococcus mutans* においてバイオフィーム構造を強固にする。また、MV に含まれる毒素は宿主細胞まで運搬され、宿主細胞内に移行した毒素は宿主細胞の細胞死を引き起こす。MV は細胞壁成分を含有しており、免疫原性を示す。結核菌やウェルシュ菌が産生する MV は TLR2 シグナリング経路を介して宿主の免疫系を調節すると考えられている。

まり免疫原性は MV に普遍的な特性であると考えられ、MV はヒト常在細菌を含む細菌-宿主間相互作用において重要な役割を有していると予想される。これまでの MV 研究の多くは病原性細菌が用いられており、MV は細菌の病原性との深い関連が示唆されている一方、環境中サンプルからも MV が単離されることから、病原細菌のみならず広い微生物が MV を産生すると考えられる。プロバイオティクスとしても用いられる乳酸菌である *Lactobacillus rhamnosus* の JB-1 株は MV を産生し、その MV が免疫調節能を有することが報告されている¹⁹⁾。つまり、MV は病原性のみならず腸管内細菌叢に含まれる細菌と宿主との相互作用にも関与する可能性があり、今後の研究進展が望まれる。また免疫原性を有する MV をワクチンに応用する研究も盛んに行われており、MV を皮下に免疫することで感染から防御できるといった結果が多く報告されている^{20, 21)}。実際に欧米では MV が髄膜炎菌ワクチンとして認証されている²²⁾。さらに MV を鼻腔に免疫することによって全身の粘膜面に MV 由来細菌特異的な分泌型 IgA の誘導を促進できることが明らかとなり、粘膜性免疫においても MV は有用であることが示されている²³⁾。今後の MV 応用研究の進展によってグラム陽性菌の MV を用いた宿主の免疫を効率的に誘導および抑制する新技術の開発に繋がることが期待される。

MV は微生物の集合体であるバイオフィームからも単離され、バイオフィーム中での物質運搬を担っており、さらに MV 自身がバイオフィームの骨格であるマトリクスとして機能すると考えられている²⁴⁾。バイオフィームは微生物の定着性を向上させ、慢性感染や院内感染と深く関連している。口腔のう蝕（虫歯）の原因である *Streptococcus*

mutans は DNA を含む MV を産生し、MV に含まれる細胞外 DNA がバイオフィームのマトリクスとして、その構造を強固にしていることが示唆されている（図 3）²⁵⁾。また、グラム陽性菌には *Streptococcus* 属や *Bacillus* 属細菌のように高い自然形質転換能を保持する細菌種が存在することから、MV が輸送する核酸は遺伝子の水平伝播にも関与する可能性がある。

メンブランベシクルの生合成

上述のように MV は多様な機能を有しており、その産生機構を知ることによって細菌の病原性の理解や MV の応用技術へ結びつくと考えられる。グラム陰性細菌では様々な遺伝子変異株や制御因子を用いた解析より、多くの MV 産生関連遺伝子が同定され、様々な MV 機構が提唱されている²⁶⁾。これらの MV 産生機構に共通することとして細胞膜がたわむことが挙げられる。さらに最近、細胞集団の一部で能動的に誘導される細胞死が MV 産生を誘導することも明らかになっている⁸⁾。一方グラム陽性細菌の場合、最外層はペプチドグリカンやミコール酸に覆われており、これらの厚く固い細胞壁を通して MV がどのように産生されるかは不明な点が多いままである。おそらくグラム陽性菌では (1) 細胞質の内圧の増加、(2) プロテアーゼや細胞壁分解・修飾酵素の発現量および局在性の変化、(3) 細胞壁を貫通するタンパク質チャネルの存在、などの機構が協調することにより、MV 産生が引き起こされると予想されている⁴⁾。グラム陽性菌では MV 産生に関連する遺伝子の報告は少ないものの、*L. monocytogenes* ではシグマ因子をコードする *sigB* が *M. tuberculosis* では

図 4. MV を介した様々な生物間相互作用のモデル

virR が MV 産生に関与することが示唆されている^{27, 28)}。EM による観察の結果から、結核菌の *virR* 変異株では MV が過剰に産生されるようになることが明らかとなった。前述のとおり、結核菌の MV はリポタンパク質といった免疫調節因子を含むことから、*virR* 変異株の感染は宿主マクロファージのサイトカイン産生を過剰に誘導し、その結果、結核菌は宿主細胞内で生存することができない。*virR* 変異株は通常培地での生育には全く影響を与えないことから、*virR* は MV を介した免疫調節因子の放出に寄与すると示唆される。また我々はウェルシュ菌においてレスポンスレギュレーターをコードする *spo0A* を破壊することによって、その MV 産生が著しく低下することを見出している（未発表データ）。Spo0A は飢餓などの細胞外環境に応答してその活性が変化することによって、芽胞形成やバイオフィルム形成の制御に関与することが知られている^{29, 30)}。つまり、ウェルシュ菌において MV 産生は周囲の環境に応答して誘導されていることが示唆される。グラム陰性菌においても周囲の環境に応答して MV 産生が誘導されることや、その構成成分に変化が生じることが明らかとなっている^{31, 32)}。つまり、様々な細菌は周囲の環境に応答し、MV の産生およびその内容物を変化させ、環境適応していると予想される。

MV は海水といった自然環境中から単離でき、溶液中で高い安定性、残存性を有していることが示されているが、一方で細菌が分泌する物質や宿主因子によって積極的に分解される場合がある。枯草菌が分泌するリポペプチドである surfactin はバイオサーファクタントとして機能し、枯草菌および炭そ菌が産生する MV の分解活性を有している³³⁾。このことは細菌自身が細胞外に放出された MV の量を調節する機構を有しており、自己もしくは他者が産生した MV を積極的に分解することによって MV を介した細胞間相互作用を制御している可能性を示している。また炭そ菌や黄色ブドウ球菌の産生する MV は血清成分によって分解されることが明らかとなっている^{10, 19)}。宿主細胞にとって MV の分解は、MV による病原因子の運搬を阻害する一方、内容物である病原因子を拡散することに繋

がる。このような積極的な分解が細菌もしくは宿主にどのような利益を与えているかは不明であるが、宿主側の因子によっても MV 量や物質の運搬が調節されうる事実は興味深いといえる。これらの事実を踏まえると、細菌は周囲の環境に応答し、MV 産生量もしくは分解量を調節することによって細菌間もしくは細菌-宿主間相互作用を能動的に制御していると考えられる（図 4）。

おわりに

これまで厚く固い細胞壁を有するグラム陽性細菌では、細胞膜に由来する MV の産生は難しいと考えられており、MV 産生は受動的な細胞死や脂質の自己会合といったアーティファクトと捉えられがちであった。しかしながら多くの報告において滅菌した細菌からは MV 産生は観察されず、MV 産生には能動的な代謝が必須であることが示されている。さらには、本稿で示したようにグラム陽性菌においても複数の遺伝子が MV 産生に関与することが明らかになりつつある。つまり、これらの事実はグラム陽性菌においても MV は能動的に産生されていること示しているに他ならない。これまでにグラム陰性、陽性細菌問わず、MV 産生が全くない遺伝子変異株が取得されたという報告がないことや、様々な細菌種において MV が産生されているという事実を合わせると、MV 産生は細菌にとって不可欠な機能であり、生育環境に応じて複数の遺伝子によって複雑に制御されていることが予測される。特にグラム陽性菌において、MV 研究分野の歴史は浅く、まだ多くの疑問や不明な点が残されたままである。しかし、MV による細菌間もしくは界を超えた相互作用の機構解明は、ワクチン開発のシーズや腸内における細菌の宿主への作用、ドラッグデリバリーシステムといった様々な応用分野への展開が期待できると考えられる。本総説が、MV に関する皆さまの理解と関心が深まる一助となることを期待している。

謝 辞

本研究は日本学術振興会科学研究費助成事業、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業によるサポートを受けましたこと感謝いたします。

参 考 文 献

- Toyofuku M, Tashiro Y, Hasegawa Y, Kurosawa M, Nomura N. (2015) Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. *Adv Colloid Interface Sci* doi:10.1016/j.cis.2015.08.013.
- Kim JH, Lee J, Park J, Ghoo YS. (2015) Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol* 40:97-104.
- Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE, Thompson AW, Summons RE, et al. (2014) Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science* 343:183-186.
- Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13:620-630.
- Schooling SR, Beveridge TJ. (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* 188:5945-5957.
- Nakao R, Kikushima K, Higuchi H, Obana N, Nomura N, et al. (2014) A novel approach for purification and selective capture of membrane vesicles of the periodontopathic bacterium, *Porphyromonas gingivalis*: membrane vesicles bind to magnetic beads coated with epoxy groups in a noncovalent, species-specific manner. *PLoS One* 9:e95137.
- Toyofuku M, Roschitzki B, Riedel K, Eberl L. (2012) Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J Proteome Res* 11:4906-4915.
- Turnbull L, Toyofuku M, Hynen AL, Kurosawa M, Pessi G, et al. (2016) Explosive cell lysis is a novel mechanism for the biogenesis of membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun* Accepted.
- Ionescu M, Zaini PA, Baccari C, Tran S, da Silva AM, et al. (2014) *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E3910-3918.
- Thay B, Wai SN, Oscarsson J. (2013) *Staphylococcus aureus* alpha-toxin-dependent induction of host cell death by membrane-derived vesicles. *PLoS One* 8:e54661.
- Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, et al. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics* 9:5425-5436.
- Lee J, Lee EY, Kim SH, Kim DK, Park KS, et al. (2013) *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles carry biologically active beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 57:2589-2595.
- Rivera J, Cordero RJ, Nakouzi AS, Frases S, Nicola A, Casadevall A. (2010) *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19002-19007.
- Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun PG, Darmon E, et al. (2004) Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:207-233.
- Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. (2015) Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol* 15:375-387.
- Prados-Rosales R, Baena A, Martinez LR, Luque-Garcia J, Kalscheuer R, et al. (2011) Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *J Clin Invest* 121:1471-1483.
- Harding CV, Boom WH. (2010) Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat Rev Microbiol* 8:296-307.
- Jiang Y, Kong Q, Roland KL, Curtiss R, 3rd. (2014) Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *Int J Med Microbiol* 304:431-443.
- Al-Nedawi K, Mian MF, Hossain N, Karimi K, Mao YK, et al. (2015) Gut commensal microvesicles reproduce parent bacterial signals to host immune and enteric nervous systems. *FASEB J* 29:684-695.
- Prados-Rosales R, Carreno LJ, Batista-Gonzalez A, Baena A, Venkataswamy MM, et al. (2014) Mycobacterial membrane vesicles administered systemically in mice induce a protective immune response to surface compartments of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio* 5:e01921-01914.
- Nieves W, Asakrah S, Qazi O, Brown KA, Kurtz J, et al. (2011) A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine* 29:8381-8389.
- Acevedo R, Fernandez S, Zayas C, Acosta A, Sarmiento ME, et al. (2014) Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Front Immunol* 5:121.
- Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Ainai A, et al. (2011) Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* elicit a mucosal immune response. *PLoS One* 6:e26163.
- Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N. (2015) Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem* 80:7-12.
- Liao SM, Klein MI, Heim KP, Fan YW, Bitoun JP, et al. (2014) *Streptococcus mutans* Extracellular DNA Is Upregulated during Growth in Biofilms, Actively Released via Membrane Vesicles, and Influenced by Components of the Protein Secretion Machinery. *J Bacteriol* 196:2355-2366.
- Schwechheimer C, Kuehn MJ. (2015) Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 13:605-619.
- Lee JH, Choi CW, Lee T, Kim SI, Lee JC, Shin JH. (2013) Transcription factor sigmaB plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria monocytogenes*. *PLoS One* 8:e73196.
- Rath P, Huang C, Wang T, Wang T, Li H, et al. (2013) Genetic regulation of vesiculogenesis and immunomodulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E4790-4797.
- Steiner E, Dago AE, Young DI, Heap JT, Minton NP, et al. (2011) Multiple orphan histidine kinases interact directly with Spo0A to control the initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. *Mol Microbiol* 80:641-654.
- Obana N, Nakamura K, Nomura N. (2014) A Sporulation Factor Is Involved in the Morphological Change of *Clostridium perfringens* Biofilms in Response to Temperature. *J Bacteriol* 196:1540-1550.

- 31) Tashiro Y, Ichikawa S, Shimizu M, Toyofuku M, Takaya N, et al. (2010) Variation of Physiochemical Properties and Cell Association Activity of Membrane Vesicles with Growth Phase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **76**:3732–3739.
- 32) Toyofuku M, Zhou S, Sawada I, Takaya N, Uchiyama H, Nomura N. (2014) Membrane vesicle formation is associated with pyocin production under denitrifying conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environ Microbiol* **16**:2927–2938.
- 33) Brown L, Kessler A, Cabezas-Sanchez P, Luque-Garcia JL, Casadevall A. (2014) Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* are disrupted by the lipopeptide surfactin. *Mol Microbiol* **93**:183–198.

Functions and biosynthesis of membrane vesicles produced actively by Gram-positive bacteria

Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Abstract

The membrane vesicle (MV) is a 20 to 500 nm spherical structure produced by various pathogenic and environmental bacteria. Because the MV contains multiple bacterial components, such as proteins, nucleic acids, membrane and cell wall, it acts as a vehicle for the components and is associated with bacterial and bacteria-host interaction. Since Gram-positive bacteria possess the thick rigid cell wall, MVs in these bacteria has been less noticed. Recently, many Gram-positive bacteria have been reported to produce MVs, suggesting that vesiculogenesis is a conserved integral function of bacterial cells. In this review, we mainly describe the recent research progress of MV function and biosynthesis in Gram-positive bacteria.