

令和元年6月18日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08457

研究課題名(和文) 限定的発現遺伝子群espの機能解析による新たな細菌特性の解明

研究課題名(英文) New bacterial characteristics based on esp genes

研究代表者

森川 一也 (Morikawa, Kazuya)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90361328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細菌が多様な環境を生き抜いていく際、各々の細胞が全て生き残る必要はない。一部の細胞が発現させる鞭毛タイプを確率的に切り換えて宿主免疫を回避したり、DNA取り込み装置を発現させて外来遺伝子を獲得したりする。このような場合、通常発現していない遺伝子が一部の細胞で発現する(限定的発現)。申請者らは多数の限定的発現遺伝子を見出し、esp遺伝子と名付けたが、その多くの機能が不明である。本研究ではそれらの解明に取り組み、esp17が乾燥耐性を担うことを示す遺伝学的な証拠を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とした黄色ブドウ球菌は乾燥に強く、乾燥表面で数ヶ月以上生き残る。ヒト-モノ(例えばドアノブなど)-ヒトという感染経路を成立させる上で乾燥耐性は重要な特質であるが、乾燥耐性の実際のメカニズムは実はよく分かっていない。esp17は高浸透圧での増殖には必要ないものであった。すなわちesp17は未だメカニズムが不明な乾燥耐性に浸透圧耐性以外の仕組みで寄与する因子である可能性がある。その仕組みについて今後明らかにすることでこの重要なヒト病原細菌の新たな側面が明らかになる。

研究成果の概要(英文)：Survival of only subpopulation of cells (rather than all of the cells) is the ordinary strategy for bacteria to cope with diverse environments. Certain species switches the type of flagellar to escape from host immune system, and others express competence machinery to incorporate new genetic information. In such cases, expression of cryptic genes (genes that ordinary do not express) in subpopulation is important. We have identified a series of such genes, and termed "esp: expression in subpopulation", but function of many esp genes still elusive. This study aimed to clarify the functions of esp genes, and found that esp17 is responsible for the resistance to dryness.

研究分野：細菌分子遺伝学

キーワード：黄色ブドウ球菌 不均一性 esp

1. 研究開始当初の背景

細菌が多様な環境を生き抜いていく際、各々の細胞が全て生き残る必要はない。一部の細胞が発現させる鞭毛タイプを確率的に切り換えて宿主免疫を回避したり、自然形質転換能を発揮して外来遺伝子を獲得したりする。細胞集団の一部の適応・進化を前提として種の存続を図るこのような生存戦略は、両賭戦略や保険仮説という概念で理解されている。ここでは、通常発現していない遺伝子 (cryptic gene) が一部の細胞で発現する (限定的発現) ことが重要であり、そのメカニズムには phase variation (プロモーターの逆位、IS 配列の出入り、遺伝子再構築などの遺伝学的変化が一定確率で起こる) や bi-stability (フィードバック制御を含む制御ネットワークが2つの安定状態を生む) が知られている。

トランスクリプトーム解析及びプロテオーム解析データ (計 64 条件) によると、黄色ブドウ球菌の約 2600 遺伝子の中にこれまで発現が検出されていない遺伝子が 128 個 (88 個の外来遺伝子と 40 個の黄色ブドウ球菌遺伝子) 存在する。申請者らは外来遺伝子を除く 40 個の発現未検出遺伝子 (cryptic gene) のうちからレポータ解析によって 21 種類の限定的発現遺伝子を見出し、*esp* (expression in minor subpopulation) 遺伝子と名付けた (*esp1~21*)。このうちの1つ *esp16=comGC* (DNA 取り込み装置遺伝子) については少数の細胞で発現して自然形質転換能を発揮させることを世界に先駆けて証明しており、本菌の進化特性の理解に大きく貢献した。しかしながら、残り 20 種類の *esp* 遺伝子群が担う生物学的役割は全く明らかになっていない。これら *esp* 遺伝子群の機能を解明することによって、新規な両賭戦略・保険戦略システム等の細菌特性を解明することができる可能性が高い。

2. 研究の目的

限定的発現遺伝子 *esp1~esp21* の役割を解明することで、細胞集団の多様化に基づく新規な細菌特性を明らかにすることを目標とする。これを達成するために *esp* 遺伝子群の役割・分子機能、発現メカニズム (発現条件) について、以下の目的を設定する。

- ・ *esp1~21* の役割・分子機能を明らかにする。

esp 遺伝子が発現することで、どのような表現型が現れるかを明らかにする。ストレス適応能と、病原性に関わる諸特性が変化するかどうかを明らかにする。次いで各表現型を生じさせる各限定的発現遺伝子の機能を解明する。

- ・ *esp1~21* の発現メカニズム・条件を明らかにする。

限定的発現が遺伝的变化によるものかどうか、phase variation にカテゴライズされるものかどうかを明らかにする。*esp16=comGC* の如く頻度が環境に応答して変化する場合には、関与するシグナル伝達系を決定し、限定的発現が起こる条件を明らかにする。

3. 研究の方法

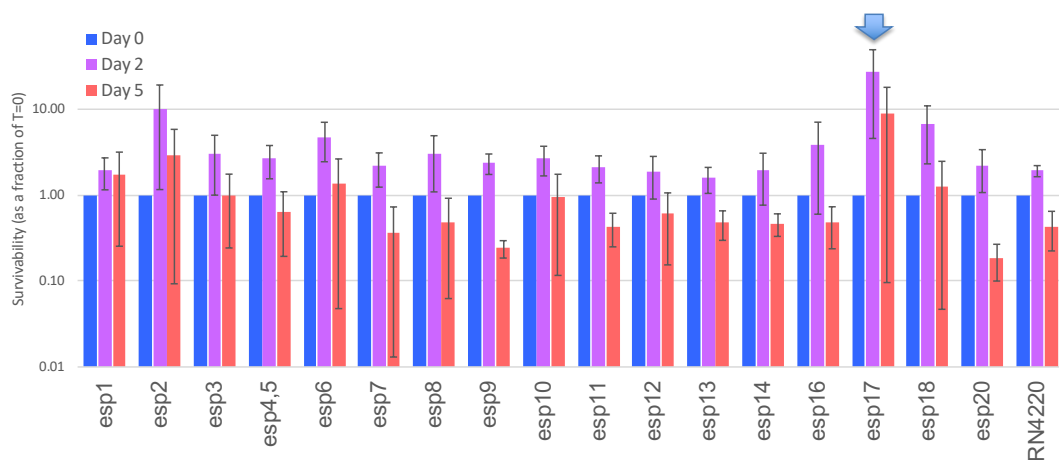
esp 遺伝子群 (*esp1~21* のうち *esp16=comGC* を除く 20 遺伝子) の強制発現株、破壊株、および強制発現株と破壊株の混合集団が示す各種病原性、ストレス耐性などの諸特性を明らかにする。*esp* の限定的発現メカニズムについては、*comGC* の如く環境に応答して頻度が変化する場合には限定的発現の誘導シグナル系を特定することで、各限定的発現システムの作動条件を明らかにする。

4. 研究成果

強制発現用プラスミドの作成には Gateway システムを応用した。これにより、今後組み換え

タンパク質発現などにも対応できる材料を構築した。発現量が異なる強制発現ベクターを 2 種類（強発現用と低発現用）作成した。これらは強度の異なるプロモーター配列を用いており、組み込む遺伝子の発現量が異なる。各発現限定遺伝子を 2 種類の強制発現プラスミドに組み込み、黄色ブドウ球菌 RN4220 株および N315 株に導入した。これにより発現限定遺伝子それぞれにつき 4 種類の強制発現株を得た。RN4220 高発現プラスミド導入株において、いずれの発現限定遺伝子の場合にも増殖速度の低下は見られなかった。強制発現は全ての *esp* 遺伝子について取得することができた。ただし、タンパク質レベルでの発現確認は行っておらず、*esp* 遺伝子群に致死遺伝子が含まれるかどうかはさらに検討を重ねる必要がある。破壊株の作成にも着手し、現在も順次進行中である。

各強制発現株の性状（コロニー形態、寒天培地上でのスプレッディング、各種薬剤感受性、糖の利用などの各種細菌生化学的特徴、ポリスチレン表面への接着、乾燥耐性度など）を調べた。このうち *esp17* と名付けた発現限定遺伝子の強制発現株で乾燥耐性化が認められた（図）。



esp 過剰発現株の乾燥耐性度の比較

親株（RN4220）と比べて *esp17* 過剰発現株は乾燥表面での生存率が上昇した。

esp17 は転写因子であると予測され、その食塩耐性への関与を示唆する論文報告があるが、具体的な食塩耐性化・乾燥耐性化メカニズムは不明である。複数の株を調べたところ、*esp17* は比較的乾燥耐性度が低い株でのみ乾燥耐性に寄与することが明らかとなった。また *esp17* は高浸透圧での増殖には必要ないものであった。すなわち *esp17* は未だメカニズムが不明な乾燥耐性に浸透圧耐性以外の仕組みで寄与する因子であることが示唆され、その仕組みについてはさらに研究を継続中である。本研究によって、細胞集団の不均一性が本菌の乾燥耐性メカニズムを担うという新たな可能性が示唆された。

また *esp2* 過剰発現が増殖を阻害すること、逆に *esp2* ノックアウトによって増殖が若干促進されることを明らかにした。*esp2* の具体的な機能についても今後の研究課題である。加えて、*esp6* が PTS システムの一部である可能性を見いだしている。

一方、その他の *esp* の機能に関しては手がかりが得られていない。各 *esp* 遺伝子単独ではなく、オペロンなどの一連の遺伝子群が発現することが必要である可能性があり、オペロンを形成している *esp* に関してはその全体の強制発現株の構築をすすめた。さらに *esp* 機能を明らかにするための新たな戦略を考案し、必要な共同研究体制を整えて再構築した研究計画をすすめている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 9 件）

1. Vishal Gor, Aya Takemura, Lisa Maudsdotter, Kazuya Morikawa. Survival of *Staphylococcus aureus* under dry conditions: possible involvement of esp genes. TGSW 2017
2. Vishal Gor, Aya Takemura, Lisa Maudsdotter, Kazuya Morikawa. Survival of *Staphylococcus aureus* under dry conditions: possible involvement of esp genes. 19th International Conference on Bacilli & Gram-Positive Bacteria. 2017
3. 森川一也, Vishal Samir Gor, 竹村彩, Lisa Maudsdotter 黄色ブドウ球菌が乾燥下で生き抜くメカニズム：限定的発現遺伝子の関与の可能性 シンポジウム “Sleeping Microbes:眠れる微生物の秘めたる力” 第90回日本細菌学会総会 2017
4. Vishal Samir Gor, Aya Takemura, Kazuya Morikawa. Two esp (expression in minor subpopulation) genes confer dry stress resistance to *Staphylococcus aureus*. Poster 第90回日本細菌学会総会 2017
5. Aya J Takemura and Kazuya Morikawa. Reversible mutations in agr locus in *Staphylococcus aureus*. VI International Conference on Environmental, Industrial, and Applied Microbiology. (BioMicroWorld 2015) 2015
6. Kazuya Morikawa, Nguyen Thi Le Thuy, Aya Takemura, Ryosuke Ohniwa, Tarek Msadek. Natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. Life and Medical Sciences in South East Asia. TGSW 2015
7. Aya Takemura, Kazuya Morikawa. A part of Agr-deficient ‘stealth’ *Staphylococcus aureus* can regain its virulence during phagocytosis. The 9th Tsukuba Medical Science Research Meeting, 2015
8. Kazuya Morikawa. Adaptation beyond the stress response: Cell structure dynamics and population heterogeneity in *Staphylococcus aureus*. Biomedical Science Forum 2015
9. Veronica Medrano Romero, Kazuya Morikawa. Competence regulators in Gram-positive bacteria. 3rd International Congress on Bacteriology and Infectious Diseases 2015

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ：<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/microbiology/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。