

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02652

研究課題名(和文)限定的発現遺伝子群espが担う新たな細菌特性の解明

研究課題名(英文)Bacterial characteristics based on esp (expression in minor subpopulation) 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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは亜集団で発現する遺伝子を黄色ブドウ球菌に見出し、esp(expression in minor subpopulation)遺伝子と名付けました。私たちはesp発現細胞で他にどのような遺伝子群が発現しているかを明らかにし、その情報から各espの機能を推定することを目指しています。本研究ではそのための実験系を完成させました。さらにesp15(com遺伝子：DNA取り込みに関係する)についての研究が進み、本菌はバイオフィルム中で複雑なシグナル伝達系に制御されつつcom遺伝子群を発現させて自然形質転換によって遺伝子を良く取り込むことを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、常在菌、日和見感染菌、薬剤耐性菌として生き続け進化してきた黄色ブドウ球菌の新たな特性を細胞集団の不均一性の視点から理解しようとする基礎研究です。例えばメチシリン耐性株(MRSA)が我が国を含め世界中に蔓延していますが、この誕生のプロセスにも不均一性が深く関係することが明らかになりました。具体的には本菌はバイオフィルムという環境で「DNA取り込み装置」を一部の細胞で発現させてメチシリン耐性遺伝子を獲得できることがわかり、耐性菌の出現や拡散のプロセスの一部の理解に貢献しました。

研究成果の概要(英文)：We previously found genes expressed in a subpopulation of *Staphylococcus aureus* and named them esp (expression in minor subpopulation) genes. We aimed to determine what kind of genes are expressed in esp-expressing cells and to infer the function of each esp gene from this information. In this study, we have established an experimental system for this purpose. We also made significant progress on esp15 (com gene: related to DNA uptake), and have shown that the com genes are expressed in biofilms under the control of a complex signal transduction system, and that the bacteria efficiently take up the genes by natural transformation.

研究分野：細菌分子遺伝学

キーワード：黄色ブドウ球菌 MRSA 薬剤耐性菌

### 1. 研究開始当初の背景

細菌が様々な局面で生き抜くには、各々の細胞が 100%生き残る必要はない。一部の細胞が鞭毛タイプを確率的に切り換えて宿主免疫を回避するサルモネラ菌、一部の細胞が自然形質転換能を発揮して外来遺伝子を獲得する黄色ブドウ球菌などがある。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、両賭戦略や分業などの概念で理解されている。そ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)ことが重要である。

我々は限定的発現遺伝子を黄色ブドウ球菌に見出し、*esp*(expression in minor subpopulation)遺伝子と名付けた。このうちの一つ *esp15* = *comGC*(DNA 取り込み装置遺伝子群の 1 つ)は自然形質転換能を担うことを解明し、本研究においても本菌の進化特性の理解が大きく進んだ。一方で、多くの *esp* 遺伝子群の役割は不明であることから、「限定的発現」に基づく細菌特性の多くを我々はまだ理解していないとすることができる。

本研究は、共生菌・日和見感染菌・薬剤耐性菌として生き続けてきた本菌の特性を「限定的発現」というコンセプトを鍵として解き明かそうとする基礎研究である。具体的な「問い」は、*esp* 遺伝子群がどのような機能を担い、どのような細菌特性を成立させているのか、そしてその特性が本菌の生き残り戦略や制圧困難さにどのような役割を果たすのか、である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、*esp* が生む細胞集団の多様性に基ついた新たな特性を明らかにすることである。具体的には、「各 *esp* 遺伝子と同時に発現する遺伝子セット」を同定し、それらがどのような機能を持ち、集団内でどのような役割を担うかを解明することで、黄色ブドウ球菌の環境適応能力・病原性等に関する新たな側面を明らかにすることを目指すものである。

### 3. 研究の方法

従来、多様性を伴うシステム(鞭毛タイプ、溶血能の切り換え等)の研究は、変化する表現型の解析からその原因遺伝子の解明へと展開してきた。これに対して本研究は *esp* という独自に見出した遺伝子群の解析から未知システムを解明する新たなアプローチをとる。このような構想は H25 住友助成により着手した独自のものである。我々が見出した限定的発現遺伝子の多くが機能未知であるが、少なくともこれまで機能を明らかにした *esp15*, *esp17* は本菌の重要な特性を担うものであった。残された多くの機能未知 *esp* の役割解明に挑む本研究は、独自の構想のもとで限定的発現に基づく新たな細菌特性を解明しようとするものである。

*esp* 遺伝子群の役割を明らかにするための本研究を行う上で、各 *esp* と「同時に発現する遺伝子セット」を決定することが重要であると考えた。*esp* 遺伝子-GFP レポータ株(を用いて、GFP 陽性細胞を回収する。次いで、RNA-seq により「同時に発現する遺伝子セット」を解明する。*esp15* のレポータ株を用いた実験を一通り完成させることで、方法を確立する。実際には様々な実験的困難があったが、後述するように *esp15* に関して同時発現遺伝子セットの解明は成功し、本研究により方法論として確立することが出来た。

#### 4. 研究成果

*esp* 発現細胞での遺伝子発現プロフィールを明らかにするために、*esp* 発現細胞をセルソーターにより回収して RNAseq まで行う実験系を完成させた (図 1)。その中でセルソーター実験におけるレポータの蛍光強度や発現頻度のクリアすべき下限が明らかとなり、レポータ強度の問題を解決するための各種レポータを取りそろえた。発現頻度条件をクリアできる培養条件の検討は今後も継続してすすめ、残された機能未知の *esp* 遺伝子の役割を解明する予定である。

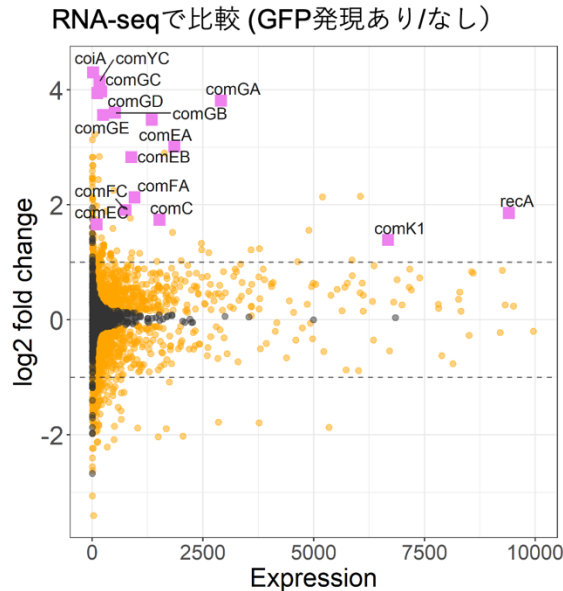


図 1 *esp15* 発現細胞の単離と RNA-seq 解析

本研究では *esp* と同時に発現する遺伝子セットを明らかにする方法を確立した。*comG*-GFP レポータ発現細胞と非発現細胞をセルソーターで分画し、RNA-seq で比較。*esp15* 発現細胞には、同時に一連の自然形質転換関連遺伝子が発現していることが確認された。本方法で各 *esp* 機能の推定が可能であると考えられる。

*esp15* (*com* 遺伝子) の機能、すなわち細胞外 DNA の取り込みと自然形質転換、については格段に研究が進み、本菌はバイオフィーム中で、複雑なシグナル伝達系に制御されつつ DNA 取り込み装置を発現させて自然形質転換によって外来 DNA を良く取り込むことを明らかにした (図 2)。さらに自然形質転換がブドウ球菌カセット染色体 (SCC) の取り込みによる MRSA 出現のメカニズムであり得ることを見出し、多くの追加実験を行って論文発表した (Nature communications) (図 3)。

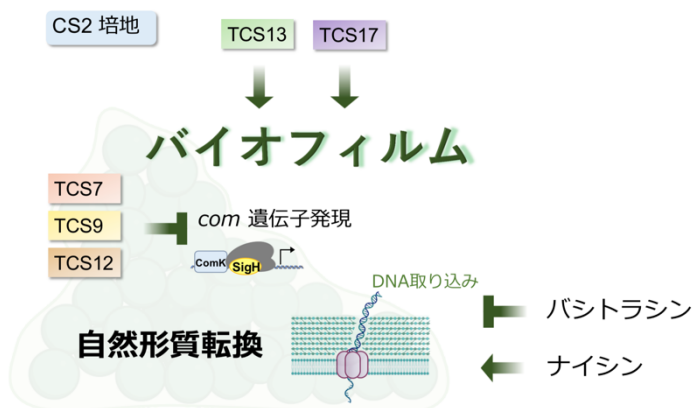


図 2 *com* 遺伝による DNA 取り込み

*esp15* (*com* 遺伝子) の発現に影響する二成分制御系 (TCS) を調べることで、本菌がバイオフィーム中で自然形質転換によって外来 DNA を取り込むことを明らかにした。また、バイオフィーム中でメチシリン耐性遺伝子 *mecA* を含むブドウ球菌カセット染色体の細胞間伝達も起こることを証明した (図 3)。

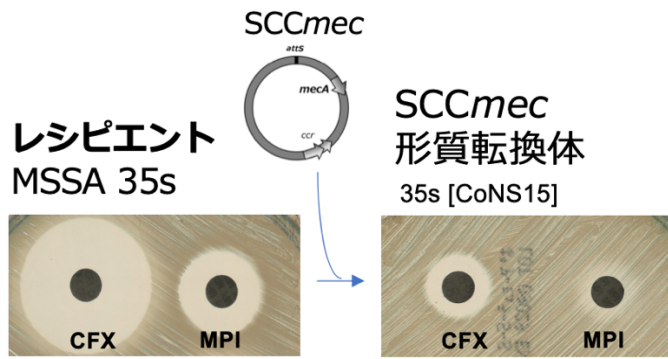


図3 SCCmec の自然形質転換

メチシリン耐性遺伝子 *mecA* を含むブドウ球菌カセット染色体 (SCCmec) の細胞間伝達方法は、MRSA の出現以来半世紀を経ても明らかにされていない。本研究では SCCmec が自然形質転換によって伝達し得ることの実験的証明に成功した。図はディスク拡散法。レシピエント (MSSA: メチシリン感受性株) のβラクタム薬 (CFX: セフォキシチン、MPI: メチシリン) の発育阻止円は大きいですが、SCCmec を自然形質転換で取り込んだものは耐性化し阻止円が小さくなっている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mais Maree, Le Thuy Thi Nguyen, Ryosuke L. Ohniwa, Masato Higashide, Tarek Msadek, Kazuya Morikawa	4. 巻 13
2. 論文標題 Natural transformation allows transfer of SCCmec-mediated methicillin resistance in <i>Staphylococcus aureus</i> biofilm.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29877-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Gor Vishal, Ohniwa Ryosuke L., Morikawa Kazuya	4. 巻 9
2. 論文標題 No Change, No Life? What We Know about Phase Variation in <i>Staphylococcus aureus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 244 ~ 244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9020244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Vishal Gor, Aya J. Takemura, Masami Nishitani, Masato Higashide, Veronica Medrano Romero, Ryosuke L. Ohniwa, and Kazuya Morikawa	4. 巻 10
2. 論文標題 Finding of Agr phase variants in <i>Staphylococcus aureus</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.00796-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Lisa Maudsdotter, Yuri Ushijima, Kazuya Morikawa	4. 巻 10
2. 論文標題 Fitness of Spontaneous Rifampicin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> isolates in a biofilm environment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.00988	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kazuya Morikawa, Yuri Ushijima, Ryosuke L Ohniwa, Masatoshi Miyakoshi and Kunio Takeyasu	4. 巻 7
2. 論文標題 What happens in the staphylococcal nucleoid under oxidative stress?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms7120631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Mais Maree, Le Thuy Thi Nguyen, Ryosuke L. Ohniwa Shenghe Huang, Masato Higashide, Tarek Msadek, Kazuya Morikawa.
2. 発表標題 MRSA emergence is mediated by natural transformation.
3. 学会等名 World Microbe Forum 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Vishal Gor, Mitsuaki Hoshi, Aya J Takemura, Masato Higashide, Veronica Medrano Romero, Ryosuke L Ohniwa, Kazuya Morikawa
2. 発表標題 Virulence Reversion in Staphylococcus aureus
3. 学会等名 1st International Electronic Conference on Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Vishal Gor, Mitsuaki Hoshi, Aya J. Takemura, Masato Higashide, Veronica Medrano Romero, Ryosuke L. Ohniwa, and Kazuya Morikawa
2. 発表標題 Prevalence of Agr Phase Variants in Staphylococcus aureus
3. 学会等名 Tsukuba Global Science Week (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mais Maree, Le Thuy Nguyen Thi, Ryosuke L. Ohniwa, and Kazuya Morikawa
2 . 発表標題 Involvement of two-component systems in development in Staphylococcus aureus
3 . 学会等名 Tsukuba Global Science Week ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Eunsam Lee, Mais Maree, and Kazuya Morikawa
2 . 発表標題 Functional analysis of nucleoid dynamics in Staphylococcus aureus.
3 . 学会等名 The 1st University of Tsukuba- University of Science Joint Young Researcher Meeting in Biomedical Science ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Nguyen Thi Le Thuy, Nguyen Thi Khanh Ngau, Le Thi Anh Phuc Nhi, Fabio Cafini, Morikawa Kazuya
2 . 発表標題 Report of Two Linezolid-Resistant Staphylococcal Isolates from University Medical Center, Ho Chi Minh City.
3 . 学会等名 The 1st University of Tsukuba- University of Science Joint Young Researcher Meeting in Biomedical Science ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mais Maree Nguyen Thi Le Thuy, and Kazuya Morikawa.
2 . 発表標題 Can “ natural transformation ” transmit SCCmec among staphylococci?
3 . 学会等名 The 1st University of Tsukuba- University of Science Joint Young Researcher Meeting in Biomedical Science ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 宮井拓哉、Nguyen Thi Le Thuy、森川一也
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌における自然形質転換の制御
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室HP研究内容 <a href="http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/microbiology/research.html">http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/microbiology/research.html</a> 筑波大学 感染生物学 (微生物学) <a href="http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/microbiology/">http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/microbiology/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	尾花 望 (Obana Nozomu) (00722688)	筑波大学・医学医療系・助教  (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フランス	Institut Pasteur		
ベトナム	Biotechnology Center of Ho Chi Minh City		