

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860313

研究課題名(和文) 新たに見出したブドウ球菌コンピテンス能の発現制御機構

研究課題名(英文) Competence regulation in *Staphylococcus aureus*

研究代表者

森川 一也 (Morikawa, Kazuya)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：90361328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌は約3割のヒトの鼻腔に棲む常在菌であるが、病原因子や薬剤耐性遺伝子の水平伝達によって進化してきた重要な病原細菌でもある。

本研究では、黄色ブドウ球菌の遺伝子水平伝達手段の一つ、自然形質転換について研究した。DNA取り込み装置遺伝子を発現させるために必要なシグナル感知・伝達因子群を同定し、さらに本菌が高効率で自然形質転換を起こす環境を明らかにした。また、いくつかの抗生物質が本菌の自然形質転換に影響することを明らかにした。本研究によって、本菌の自然形質転換による進化能力の一側面が初めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： *Staphylococcus aureus* is a commensal bacterium living in our nasal cavities. It is also an important human pathogen, and has acquired a variety of virulence factors and antibiotics resistance genes through horizontal gene transfer.

In the present study, we focused on natural genetic competence. We succeeded in identification of factors that can sense environmental stimuli and control the expression of DNA incorporation machinery. We also succeeded in identification of growth conditions that increases transformation frequency. In addition, we found that some of the currently used antibiotics can affect the natural transformation. Thus, this study first clarified new aspects on the evolutionary ability by natural genetic competence in *S. aureus*.

研究分野：細菌学

キーワード：黄色ブドウ球菌 形質転換 コンピテンス 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は約 3 割のヒトの鼻腔に棲む常在細菌であるが、多数の病原因子を水平伝達で獲得しており「毒素のデパート」とも呼ばれる。免疫力が低下した宿主に多様な病原性を示す日和見感染が従来から問題となっているが、市中感染型の強毒株は健康人にも感染して重篤な疾患を惹起する。薬剤耐性問題も深刻であり、メチシリン耐性株 (MRSA) が院内感染因子として蔓延している。今後も、多様な外来遺伝子を取り込んで新たな病原性や耐性を獲得する可能性がある。

一般にグラム陽性細菌の遺伝子の獲得機構 (水平伝達) には「接合」、「ファージによる形質導入」、「細胞外 DNA の能動的な取り込み (コンピテンス) による形質転換」の 3 つが挙げられる。これらは全て病原性や様々なストレス耐性因子の獲得、あるいは多様性の維持と直接関係する。黄色ブドウ球菌では接合プラスミドは稀である。一方、ほとんどの分離株には溶原化ファージ (プロファージ) が存在し、ファージによる形質導入は本菌の遺伝子水平伝達に大きく寄与していると考えられている。しかし、ブドウ球菌ファージによる形質導入で伝達される長さは約 45kbp が限界であり、本菌の重要な水平伝達遺伝子であるカセット染色体 (Staphylococcal cassette chromosome: SCC) には、これより長いものが存在する。コンピテンス能は、細胞膜に存在するコンピテンス装置 (DNA 取り込み装置) を介して細胞外 DNA を細胞内に取り込む能力である。本菌のコンピテンス能の証明は我々の 2012 年の論文が最初である (PLoS Pathog 2012)。

我々はコンピテンス遺伝子群 (例えば *comE*, *comG* オペロンなど) の機能発現について以下を明らかにしていた。

- (1) シグマ因子 (プロモータ認識因子) SigH がコンピテンス遺伝子群の発現を直接制御する。
- (2) SigH は通常の培養条件ではほぼ発現されない (10^{-5} 以下)。特定の完全合成培地 (CS2 培地) において SigH を発現する細胞は数パーセントにまで増加する。
- (3) 特定の株 (N315) に SigH を強制発現させ、CS2 培地で培養すると、コンピテンス状態となり外来 DNA を取り込む。これによって、プラスミドや Type II SCCmec (形質導入では伝達できないほど大きな 52kbp の SCC) が水平伝達する。

一方、SigH の強制発現によってコンピテンス装置が蛋白質レベルで発現しても、CS2 培地以外の培地ではコンピテンス能は検出されない (環境依存性)。また、コンピテンス能が検出されるのは当時 N315 由来株だけであった (株特異性)。

これらのことは、細胞外 DNA を取り込むためには、環境シグナルの感知・統合によ

って少数の細胞で誘導される SigH 発現が必須であり、さらにコンピテンス装置が実際に機能するためには特定の培養環境 (CS2 培地) に依存し、かつ株特異的な何らかの付加的条件が必要であることが考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究は以下を明らかにすることを目的とした。

(1) SigH が発現する仕組み

どのような環境シグナルが統合されて SigH の発現に至るかを解明する。

(2) コンピテンス装置が機能するために必要な条件

細胞壁構造の関与 (後述) を念頭に付加的要因を解明する。

これらによって黄色ブドウ球菌の進化局面をコンピテンス能の発揮という観点から解明し、コンピテンス能を制御する手段を提示することを目標とした。

3. 研究の方法

黄色ブドウ球菌のコンピテンス能による進化能力を理解するために必要な 2 つの課題に取り組んだ。

(1) SigH を発現させる未知メカニズムについては、

関与する上流のシグナル伝達系を明らかにする方法と、

制御に直接関わる因子を探索する方法を試みた。

これらによって必要な環境シグナルを特定し、シグナルネットワークがどのように SigH 発現制御因子に統合されるのか、を調べた。

(2) コンピテンス装置が機能するために必要な付加的条件については、細胞壁構造の関与が強く示唆されていた。細胞壁合成阻害剤などで人為的に細胞壁を不完全にすることでコンピテンス能が発揮されるかを調べた。

4. 研究成果

(1) SigH が発現する仕組み

SigH を発現させるメカニズムを明らかにするために、関与する上流のシグナル伝達系を明らかにし、制御に直接関わる因子を同定するための研究を行った。

SigH 発現に必要な環境シグナルと制御ネットワークを理解するために、SigH の発現を制御していることが期待される制御因子群の役割を調べた。

SigH 発現は環境応答的である (CS2 培地で

の8時間以上の培養で SigH 発現細胞が増加)。本条件においては、細胞密度を感知するクオラムセンシング系 (Agr 系) は SigH 発現に必須ではないことを報告していた。一方、17種類ある二成分制御系などの制御因子群の関与は不明であった。二成分制御系の各破壊株において、SigH の活性を GFP レポーターによって解析したところ、幾つかの二成分制御系が関与することを見出した。さらに、長期培養において SigH がさらに高度に発現することを見出した。長期培養においても二成分制御系の関与を調べると、8時間培養での SigH 発現に必要な二成分制御系とは異なるものが関与することが明らかとなった。このことは、複数の環境情報が SigH 発現制御に関わることを示唆するものであった。得られた二成分制御系の情報を参考に、形質転換条件をいくつか試したところ、高効率で形質転換が起こる条件を見出すに至った。本結果はパスツール研究所 Tarek Msadek、筑波大学大庭良介らとの共同研究として、投稿準備中である。

SigH が直接的にはどのようなメカニズムで少数の細胞で発現するかを明らかにするために、直接制御因子の同定を試みた。

SigH が発現するために、転写後レベルの制御が重要であることはすでに明らかにしていた。具体的には、*sigH* mRNA の 5' 非翻訳領域にある Inverted repeat (IR) が通常時に翻訳を抑制しており、CS2 培地ではこの抑制が少数の細胞で解除される。しかし、IR による翻訳抑制がどのようなメカニズムで解除されるかは明らかになっていない。本項目では、少数細胞で発現するという特徴を示すのに必要十分な mRNA 領域を同定しようと試みた。様々な長さの *sigH* mRNA (5' -UTR を含む) を *sigB* 遺伝子に融合し、SigB 活性を GFP レポーターでモニターする系を構築して、各領域が持つ翻訳活性を検討したが、各プラスミドの安定性が低下し (40-60 パーセントの細胞においてプラスミドが脱落) 頻度比較が十分にできなかった。ただし、5' -UTR から *sigH* コーディング領域上部までの短い配列を発現させた株では、IR 領域の破壊の有無によらず発現頻度が 10 パーセント前後であったのに対し、*sigH* のコーディング領域をほぼ全長含む配列を発現させた株では、IR 領域を破壊することで約 50 パーセントの細胞において SigH が発現するという知見を得ている。これは、*sigH* mRNA のうち、5' UTR に加えてコード領域も制御に関わっていることを示唆する結果であり、さらに検討を続ける必要がある。

また、翻訳制御に関わるものが報告されている Hibernation promoting factor (HPF) について、SigH 発現の制御への関与を検討した。GFP レポーターを用いた解析の結果、HPF 欠損 N315 株では SigH の発現頻度が 20~65 パーセントに上昇することを見出した (野生株の発現頻度は数パーセント)。このことは、

HPF が SigH の発現を負に制御していることを示唆する。コンピテンス能の観察されていない RN4220 株を用いて同様の試験を行ったが頻度上昇はみられなかったことから、HPF による発現制御は株依存的である可能性が高く、コンピテンス能発揮の株特異性を説明しうる手がかりを得たと考えている。

(2) コンピテンス装置が機能するために必要な条件

SigH を人為的に強制発現させてもコンピテンス能は現れず、以下のような付加的条件が必要である。

株特異性: SigH の強制発現によってコンピテンス装置を発現させても、コンピテンス能が現れる株は限定される (N315 由来株)。

環境依存性: N315 由来株に SigH を強制発現させたものでも、CS2 培地で培養しない限り、コンピテンス能は現れない。

すなわち、コンピテンス能を示すためには、コンピテンス装置 (*comG* オペロン、*comE* オペロン等にコードされ、全て SigH で誘導される) の発現だけでは不十分であり、なんらかの株特異的な要因、環境依存的な要因がコンピテンス能の発揮に必要であると考えられた。本項目では、未知の付加的条件を明らかにするために、細胞壁構造に着目した。細胞壁が関与する示唆的結果はすでに得ていた。すなわち、N315 由来株を CS2 培地で培養すると、細胞壁構造が不完全となる。この変化は SigH の発現にかかわらず起こるが、異なる系統の株 (COL 等) では細胞壁構造は不完全とはならない。

このことから「SigH によるコンピテンス装置の発現に加えて、細胞壁構造が不完全となることで、DNA がコンピテンス装置にアクセスできるようになる」と考えて研究をすすめ、以下のことを明らかにした。

細胞壁を人為的に破損させてもコンピテンス能は発揮されなかった。細胞壁分解酵素 (リゾスタフィン)、グラスビーズ、によって、SigH 過剰発現株の細胞壁を傷付けた後、形質転換効率を調べたが、効率の増加は認められなかった。

細胞壁合成阻害剤の中には形質転換効率を上げるものが存在した。SigH 過剰発現株を各種抗生物質存在下で培養し、形質転換効率を調べた。細胞壁合成阻害剤のいくつかは形質転換効率を上昇させた。その他の抗生物質についても検討したところ、形質転換を抑制するものも存在した。以上の結果は、抗生物質の処方本菌の遺伝子水平伝達に影響するという可能性を示唆するものであり、現在投稿中である (Nguyen Thi Le Thuy et al., 投稿中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Lisa Maudsdotter, Saki Imai, Ryosuke L. Ohniwa, Shinji Saito, and Kazuya Morikawa. *Staphylococcus aureus* dry stress survivors have a heritable fitness advantage in subsequent dry exposure. **Microb Infec** in press 2015

Yuri Ushijima, Ryosuke L. Ohniwa, Atsushi Maruyama, Shinji Saito, Yoshikazu Tanaka, and Kazuya Morikawa. Nucleoid compaction by MrgAAsp56Ala/Glu60Ala does not contribute to staphylococcal cell survival against oxidative stress and phagocytic killing by macrophage. **FEMS Microbiol Lett** 360, 144-151. 2014.

Le Thuy Nguyen Thi, Aya J Takemura, Yumiko Inose, Melody Tsai, Toshiko Ohta, Tarek Msadek, and Kazuya Morikawa. First evidences of genetic transformation via natural competence in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol Parasitol** 4: 114-114. 2013.

〔学会発表〕(計 7 件)

竹村彩, 森川一也 黄色ブドウ球菌は多数の機能未知遺伝子を集団の一部で発現させる 第 88 回日本細菌学会総会 2015 年 3 月 26-28 岐阜

Veronica Medrano Romero, Ryosuke Ohniwa, Le Thuy Nguyen Thi, Michel Debarbouille, Tarek Msadek, Kazuya Morikawa. Involvement of the transcription factor ComK in *Staphylococcus aureus* competence regulation. The fifth International Conference on Gram-Positive Pathogens. October 12-15, 2014 in Omaha, Nebraska.

Le Thuy T. Nguyen and Kazuya Morikawa. Effects of Antibiotics on Natural Transformation in SigH-expressing *Staphylococcus aureus*. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014) – XIVth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. July 27- August 1, 2014, Montreal Canada.

Kazuya Morikawa. Bacterial adaptation beyond the stress response.

Symposium: Three Domains of Life “from molecules to organisms” Kyoto 2014 年 3 月 29 日

Aya Takemura, Kazuya Morikawa. Exploring for new bet-hedging strategy in *Staphylococcus aureus*. 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 26-28 船堀

Le Thuy Nguyen Thi, Aya J. Takemura, Yumiko Inose, Melody Tsai, Toshiko Ohta, Tarek Msadek, Kazuya Morikawa. First evidences of genetic transformation via natural competence in *Staphylococcus aureus*. International Congress on Bacteriology and Infectious Diseases Baltimore, USA 2013 年 11 月 20 日

Aya J. Takemura, Kazuya Morikawa, Le Thuy Nguyen Thi, Yumiko Inose, Melody Tsai, Toshiko Ohta, Tarek Msadek. Expression of a Cryptic Sigma Factor Unveils Natural Competence for DNA Transformation in *S. aureus*. 7th Conference on Functional Genomics of Gram-positive Microorganisms. Italy 2013 年 6 月 23 日

〔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) 研究代表者

森川一也 (MORIKAWA Kazuya)

筑波大学医学医療系・准教授

研究者番号: 90361328