

黄色ブドウ球菌における特定亜集団の分離法の開発

関谷 来功（筑波大学生物学類）

指導教員：森川 一也（筑波大学医学医療系）

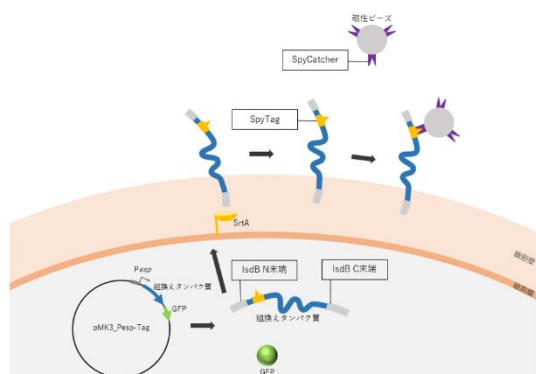
【背景・目的】

細菌の生存戦略の一つに集団の不均一性がある。例えば、急激な環境変化に対して生存可能な一部の細胞をあらかじめ存在させておくことで生き残りを図ったり（両賭け戦略）、分業したりする。このような生存戦略はまだ十分に理解されていないが、通常発現しておらず一部の亜集団でのみ発現する遺伝子（限定的発現遺伝子）が重要な役割を果たす場合がいくつか知られている。

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、表皮粘膜の常在細菌であるが、病原因子を数多く持ちさまざまな感染症を引き起こす病原細菌としても知られている。所属研究室では、黄色ブドウ球菌において 20 種類の限定的発現遺伝子を発見し、*esp* (expression in minor subpopulation) 遺伝子と名付けた。*esp15* (*comGC*) は、亜集団で機能するシグマ因子 SigH の制御下にあり、*esp15* を含む一連の自然形質転換に関わる SigH レギュロンとともに発現して DNA 取り込みに寄与する[1]。また、*esp17* はそれ自体が転写因子であり、恐らく下流の関連遺伝子を亜集団で発現させることで乾燥耐性に寄与する。しかしながら、残りの 18 種類の *esp* 遺伝子については各 *esp* 遺伝子単独の強制発現や欠失による表現型の変化が見いだされておらず、役割は不明である。これら機能未知 *esp* 遺伝子と同時に発現する遺伝子を明らかにすることが出来れば、*esp* 遺伝子の機能に関する手がかりが得られる可能性がある。

所属研究室では既に、*esp17* 遺伝子と同時に発現する遺伝子群を決定することに成功している。これは、*esp17* 発現細胞をセルソーターで単離し、それを RNA-seq 解析に供することによる。しかし、セルソーターで十分な量の細胞を得るためには 10% 程度の発現が必要であり、*esp17* 以外の多くの *esp* の発現は数パーセント以下であるため適用できていない。そこで本研究では *esp* 発現細胞を効率的に単離または濃縮する方法の構築に取り組むこととした。

具体的には、各 *esp* 発現と同時にタグを細胞表面に発現させる形質転換体を作製し、タグを利用して細胞を回収することで各 *esp* 発現細胞を分離する（図）。



図：本研究で構築しようとする各 *esp* 発現細胞の単離法

各 *esp* 発現と同時に SpyTag を発現する形質転換体を準備する。そこに SpyCatcher-磁性ビーズを加えると SpyTag と共有結合し、各 *esp* 発現細胞のみが回収できる。また、組換えタンパク質は FLAG-tag、8xHis-tag、HaloTag を含む。GFP 遺伝子は *esp* の発現を確認するために導入している。

【方法】

1) 形質転換体の作成

細胞表面に発現させるタグが機能するか確認するための予備実験として、*esp* プロモーターではなく構成的に発現する *sarA* プロモーターを組み込んだタグ発現プラスミドをもつ大腸菌をクローニングした。さらに黄色ブドウ球菌 RN4220 株に形質転換、Nef 株へ形質導入した。

2) 形質転換体における発現の確認

形質転換体において、GFP の蛍光を顕微鏡観察で検出した。組換えタンパク質については、SpyTag, FLAG-tag, His-tag の検出を細胞壁面からのウェスタンブロットによって、HaloTag の検出を蛍光リガンドを用いた顕微鏡観察によって試みた。

【結果・考察】

形質転換体 RN4220pMK3_PsarA-Tag, NefpMK3_PsarA-Tag の作製に成功した。また、これらの形質転換体において GFP による蛍光が確認できた。しかし、これらの形質転換体の細胞壁面において、組換えタンパク質を検出することはまだ出来ていない。今後さらに検討するが、発現量が低い、または細胞壁面分に局在していない可能性がある。

【今後の展望】

タンパク濃縮、他の画分における検出によって、組換えタンパク質の発現、細胞壁面分への局在を確認する。局在を確認できた際には、磁性ビーズによる細胞の回収を行う。さらに各 *Pesp* を用いた同様の実験を行い、各 *esp* 発現亜集団を分離する。一方、組換えタンパク質の発現・局在が確認できなかった場合にはベクターの再設計、もしくは別の亜集団分離法を検討する。

別の分離法として、細胞表面に発現する ComGC を利用する方法を考えている。His-tag もしくは Strep-tag が付加された ComGC を発現する株が既に構築されており、タグを付加しても自然形質転換能は正常であることが確認されている。また、黄色ブドウ球菌のもつ IgG 結合タンパク質を利用する方法も考えられる。IgG 結合タンパク質を欠失させた $\Delta spa \Delta sbi$ 株を作製し、ベクターによって各 *Pesp* 制御の下 *Spa* を発現する細胞を準備する。この細胞集団から IgG を利用して細胞を回収することで、各 *esp* 発現細胞を分離できると期待される。

【引用】

[1] Morikawa K *et al.* Expression of a Cryptic Secondary Sigma Factor Gene Unveils Natural Competence for DNA Transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 8, Article e1003003 (2012)