

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 12 年度博士課程進学

氏名 堀井 孝昭

指導教官 長澤 寛道

### 論文題目 腸球菌の性フェロモンシグナル伝達系に関する研究

腸球菌 *Enterococcus faecalis* はグラム陽性の腸内常在菌であり、院内感染の原因菌として注目されている。*E. faecalis* が持つある種のプラスミドは、プラスミド非保持菌の分泌する性フェロモンのシグナルにより保持菌（供与菌）から非保持菌（受容菌）へと高頻度に伝達される（図 1）。現在までに複数のフェロモン応答性接合伝達プラスミドが発見されており、それぞれのプラスミドが病原性や薬剤耐性等をコードしていることから、この高頻度伝達システムによる薬剤耐性遺伝子の蔓延は臨床医学上の問題になっている。性フェロモンは 7 または 8 残基のオリゴペプチドであり、プラスミド pX に対して特異的な性フェロモン cX が存在すると考えられている。プラスミド上には性フェロモンの受容体 (TraA) や自己の性フェロモンによる接合伝達の誘導を回避するためのインヒビター (ix)、受容菌と供与菌の性的凝集に関与する細胞表面のタンパク質 (aggregation substance: AS) の遺伝子などがクラスターを形成してコードされている。バクテリオシンプラスミド pPD1 では cPD1 のインヒビター iPD1 をコードする *ipd* 遺伝子が TraA タンパク質をコードする *traA* 遺伝子の上流に逆向きに存在し、そのやや下流に AS をコードする *asp* 遺伝子が存在している (図 2A)。TraA は pPD1 にコードされる 321 アミノ酸残基、38 kDa のタンパク質であり、細胞質中にその存在が確認される。TraA は既知のタンパク質と明確な相同性を示さず、配列からその機能を予想することは困難であった。一方、*traA* 遺伝子を破壊した pPD1 供与菌が常に自己凝集を示すことから TraA は性的凝集における負の制御因子であり、また [<sup>3</sup>H]cPD1 を用いたトレーサー実験から cPD1 の細胞内受容体であることが明らかになっている。その制御機構については、DNA 結合能が見られることから転写制御因子として機能している可能性が指摘されていた。本研究では pPD1 供与菌における cPD1 のシグナル伝達系に着目し、cPD1 の細胞内受容体 TraA が制御しているシグナル伝達の開始段階について解明することを目的とした。

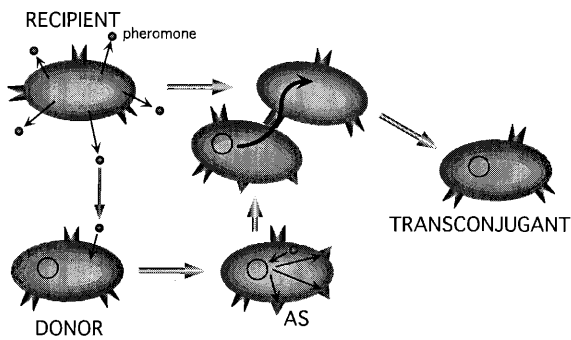


図1 腸球菌の性フェロモン応答性プラスミド伝達  
受容菌(Recipient)の分泌する性フェロモンを供与菌(Donor)が取り込み、細胞表面にASを発現する。ASの作用で凝集した供与菌と受容菌は接合し、プラスミドの伝達を行う。

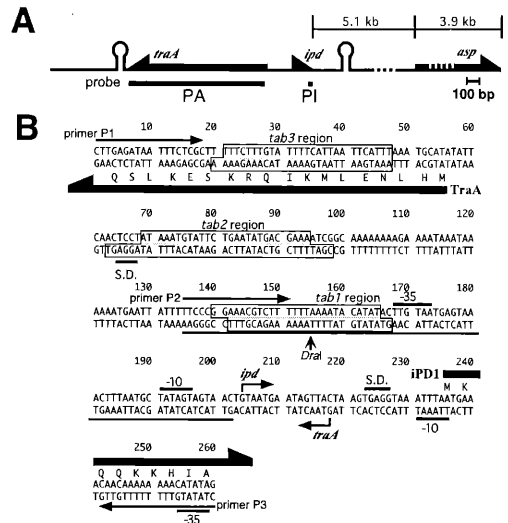


図2 pPD1上の性的凝集に関与する遺伝子  
(A) *traA*, *ipd* および *asp* の遺伝子マップ。それぞれ TraA, iPD1 および AS をコードしている。  
(B) *traA* および *ipd* 上流の TraA 結合領域の DNA 配列。下線(135-202)は図3Bで用いたプローブを示す。

## 1. 供与菌の性フェロモン認識における特異性の解析

これまでの研究から性フェロモン cPD1 は pPD1 供与菌の細胞内に取り込まれ、細胞内タンパク質 TraA に結合することが明らかにされている。また、他の性フェロモン応答性プラスミド pAD1、pCF10 にも TraA と相同性を持つ性フェロモン受容体がコードされている。本章ではプラスミド供与菌のリゾチーム処理菌体を用いて性フェロモンと供与菌体内の TraA の結合における特異性を解析した。まず、種々のプラスミド供与菌における<sup>3</sup>H]cPD1 の取り込み量を測定したところ、pPD1 供与菌のみに取り込みが見られた。このことから、cPD1 は pPD1 供与菌体の TraA にのみ特異的に認識されることが判明した。次に、これまでに構造決定のなされている性フェロモンおよびインヒビターそれぞれ5種を<sup>3</sup>H]cPD1 と競合的に pPD1 供与菌に作用させ、<sup>3</sup>H]cPD1 の取り込み量を測定した。その結果、cPD1 および iPD1 のみに<sup>3</sup>H]cPD1 の結合阻害が見られた。また、種々の cPD1 アナログペプチドを合成して同様に解析したところ、TraA に対してきわめて低い結合活性しか示さなかった。これらの結果より、pPD1 供与菌の細胞内における TraA と cPD1 および iPD1 の結合には非常に高い特異性が存在し、結合するペプチドの8残基の構造を厳密に認識していることが示された。

## 2. TraA と DNA の相互作用についての解析

### 2-1. DNA 上の TraA 結合部位の決定

これまでの研究から、pPD1 上の *traA* の一部および *ipd* 遺伝子を含む約 2.3 kb の領域を欠損すると cPD1 非応答性の表現型を示すことが明らかにされており、この領域に性フェロモンシグナル伝達に必要な領域が存在することが示唆されていた。また、この 2.3 kb の領域に相当する DNA 断片を *AluI* で消化した後に TraA を添加して電気泳動を行うと *traA* および *ipd* の上流にあたる 260 bp のバンドが特異的に消失し、この領域に TraA が結合する可能性が考えられた。そこでこの領域(図2B)における TraA 結合部位を DNase I footprinting 法により解析した。その結果、1ヶ所の顕著なフットプリント (*tab1*) と 2ヶ所のやや弱いフットプリント (*tab2*, *tab3*) が見られ、これらは *ipd* 遺伝子のプロモーターの上流に位置していた(図2B)。次に、*tab1* から *tab3* を全て含む DNA 断片

(P1-P3) および *tab1* のみを含む DNA 断片 (P2-P3) をプローブとして gel mobility shift assay による TraA の結合解析を行った (図 3A)。プローブ P2-P3 では TraA の濃度によらず一定のシフトを示すのに対し、プローブ P1-P3 では高濃度の TraA 存在下において高分子側にシフトした DNA-TraA 複合体のスメアなバンドが観察された。この結果は、低親和性の *tab2* および *tab3* 領域に複雑な結合様式で TraA が結合するためと予想される。また、*tab1* のみを含む DNA 断片を *DraI* で切断するとバンドのシフトが見られず、TraA が *tab1* 領域に結合していることが確認された。

## 2-2. TraA の DNA 結合活性に対する cPD1/iPD1 の影響の検討

*tab1* のみを含む DNA 断片をプローブとして gel mobility shift assay を行い、TraA-DNA 複合体に対する cPD1 および iPD1 の影響を検討した。その結果 cPD1 を加えた際にわずかな移動度の増加が見られたが、iPD1 を加えたときにはさらに移動度が増加した (図 3B)。これは、iPD1 が結合することによって TraA-DNA 複合体に何らかの高次構造の変化が起こっているためと考えられる。

## 2-3. TraA-DNA 複合体における DNA bending についての解析

DNase I footprinting および gel mobility shift assay において cPD1 および iPD1 添加による TraA の DNA 結合親和性への影響は見られず、TraA は常に DNA に結合した状態で転写制御を行っていると考えられた。さらに 2-2 の結果より、DNA bending の現象が起こっている可能性が示唆された。*tab1* 領域を含む DNA 断片を組み込んだ bending assay ベクターを各種制限酵素で切断した約 150 bp の DNA 断片 10 種を用いて、TraA について DNA bending assay を行った。その結果、TraA 存在下で DNA bending が見られ、移動度の検討から TraA の結合によって 57 度の DNA bending が起こっていると計算された。cPD1 および iPD1 を加えて同様の実験を行ったところ、それぞれ角度が 53 度および 43 度に緩和された。これらの角度の相対的な変化は、gel mobility shift assay におけるシフトしたバンドの移動度の変化と一致していた。

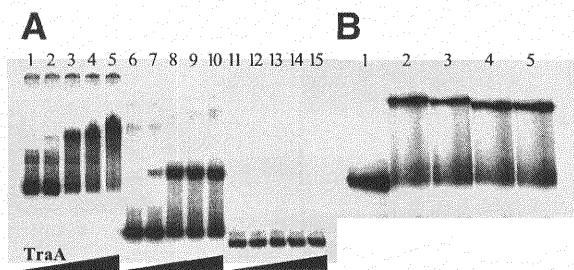


図 3 Gel mobility shift assay

(A) 1-5: probe P1-P3, 6-10: probe P2-P3, 11-15: *DraI*-digested probe P2-P3.  
(B) 1: probe only, 2: probe and TraA, 3: probe, TraA, and cPD1, 4: probe, TraA, cPD1, and iPD1, 5: probe, TraA, and iPD1.

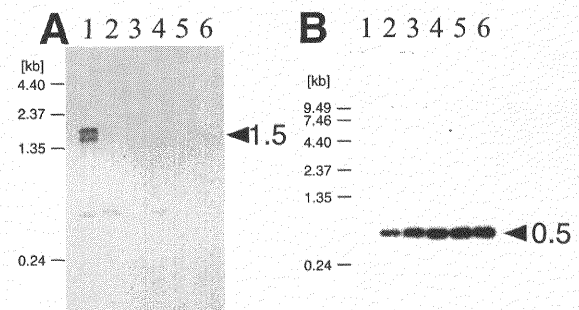


図 4 pPD1 供与菌のノーザン解析

*traA* (A) および *ipd1* (B) について、それぞれ図 2A に示すプローブ PA、PI を用いて解析した。1-6 はそれぞれ cPD1 添加前、添加後 15、30、60、90、120 分後の RNA をサンプルとした。

## 3. TraA の構造と活性についての解析

TraA の主要な活性として、性フェロモン結合活性と DNA 結合活性が明らかにされている。これらの活性を司るドメインの TraA 分子上における同定を目的として、TraA の末端欠損体の活性検定を行った。TraA の C 末端 9、45、91、155 残基または N 末端 100、200 残基を欠損して発現し、 $[^3\text{H}]$ cPD1 に対する結合活性および DNA 結合活性について解析した。その結果 C 末端 9 残基を欠損した場合のみ活性を維持しており、その他は両方の活性を失っていた。これらの結果から、TraA の部分欠損体は高次構造を維持することができず、一定以上の欠損が起こると性フェロモン結合活性と DNA 結合活性を同時に失うものと考えられる。

#### 4. *ipd* および *traA* の転写解析

pPD1 供与菌に cPD1 を添加して培養を行い、添加前と添加後の菌体より RNA を抽出して mRNA のノーザン解析を行った。その結果 cPD1 添加後直ちに *traA* の転写が減少し、*ipd* の転写が劇的に増加していた (図4)。*ipd* の転写量は cPD1 添加後 60 分間にわたって増加し続けていた。また、プライマーエクステンション法によってこれらの mRNA の転写開始点を解析したところ、これらはほぼ同じ点から転写が開始されていた (図2B)。

#### 5. TraA による転写制御機構の解析

pPD1 供与菌において *traA* 遺伝子の 3'部分を欠損した TraA 破壊株は、恒常的に細胞凝集を示す。この株から RNA を抽出して *traA* および *ipd* 遺伝子の転写についてノーザン解析を行ったところ、*traA* の転写が停止し、*ipd* の転写が活性化されていた。これは cPD1 存在下の pPD1 供与菌と同様の転写様式であり、cPD1 受容体である TraA が転写制御因子として機能している可能性が強く示唆された。

TraA および cPD1/ipd1 が以上の転写調節を行っていることを *in vitro* で検証するために、*in vitro* transcription による解析を行った。まず *E. faecalis* の菌体から3段階の精製過程を経て RNA polymerase を精製し、活性検定および各サブユニットの同定を行った。これを用いて *traA* および *ipd* のプロモーター領域にあたる DNA 断片を鋳型とした *in vitro* transcription を行ったところ、TraA 非存在下および TraA と cPD1 の存在下では TraA と ipd1 の存在下と比較して *ipd* 遺伝子の転写量が若干増加していることが観察された。

以上の結果から、*E. faecalis* の pPD1 供与菌における性フェロモン cPD1 のシグナル伝達系では TraA が細胞内受容体として cPD1 および ipd1 の構造を厳密に認識して結合し、*traA* および *ipd* 遺伝子の転写を制御することによって細胞凝集誘導の最初のステップを調節しているものと考えられる。その制御機構についてのモデルを図5に示す。通常 pPD1 供与菌の細胞内では TraA-ipd1 複合体が DNA に結合し、*traA* および *ipd* は低レベルで転写されている。ここに受容菌の分泌する cPD1 が取り込まれて一定以上の濃度に達すると、ipd1 と競合的に cPD1 が TraA に結合し、*traA* の転写が停止すると共に *ipd* の転写が活性化される。*traA* の転写が停止して一定の時間が経過すると細胞内の TraA 濃度が減少し、開放されたプロモーターからはさらに高レベルの *ipd* の転写が行われる。転写された *ipd* の RNA が何らかの形で下流の遺伝子の発現を制御し、最終的に細胞の接合およびプラスミドの伝達が誘導される。

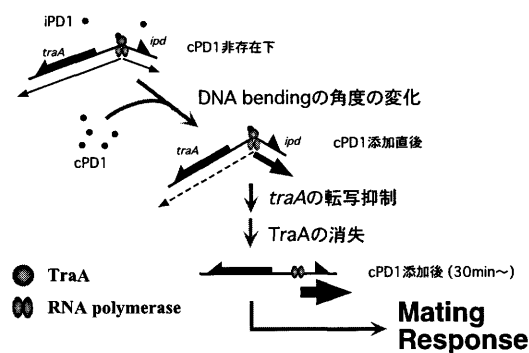


図5 TraA による転写制御機構のモデル

#### 参考文献

Horii, T., H. Nagasawa, and J. Nakayama. 2002. Functional analysis of TraA, the sex pheromone receptor encoded by pPD1, in a promoter region essential for the mating response in *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. 184:6343-6350.