

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 堀井 孝昭

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。それら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。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を抑制するインヒビター (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。プラスミド pPD1 ではインヒビター 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* 遺伝子上流に逆向きに存在している。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ている。*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、cPD1 の細胞内受容体であること、また、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。本研究は pPD1 供与菌における 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を解明したもので、序論およびそれに続く 6 章からなる。

序論では、上記の研究背景を述べている。

第 1 章では、pPD1 供与菌の性フェロモン認識における特異性の解析を行っている。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 の結合の特異性を解析したところ、 ^3H cPD1 の取り込みは pPD1 供与菌のみに認められた。また、他の性フェロモンやインヒビターによる ^3H cPD1 の取り込み阻害活性を見たところ、cPD1 および iPD1 のみに阻害が見られた。これらの結果から、pPD1 供与菌内における TraA と cPD1 および iPD1 の結合には非常に高い特異性が存在していることが示された。

第 2 章では、大腸菌発現系を用いて TraA を GST との融合タンパク質として大量発現し、精製後に GST を除去し、最終精製を行って、TraA 組み換え体タンパク質を得たことを述べている。

第 3 章では、pPD1 上の *traA* の一部および *ipd* 遺伝子を含む約 2.3 kb の領域に TraA が結合する可能性が考えられたので、TraA 結合部位を DNase I footprinting 法により解析したことを述べている。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。さまざまな DNA 断片を用いてゲルシフトアッセイを行った結果から、*tab1* が最も親和性が高く、*tab2* および *tab3* は親和性が弱いことがわかった。次に、*tab1* のみを含む DNA 断片をプローブとしてゲルシフトアッセイを行い、TraA-DNA 複合体に対する cPD1 および iPD1 の影響を検討したところ、cPD1 を加えた際にわずかな移動度の増加が見られ、iPD1 を加えたときにはさらに移動度が増加したことから、複合体に高次構造の変化が起こっていると推定した。すなわち、DNA bending が起こっている可能性が示唆されたので、*tab1* 領域を含む DNA 断片を用いて DNA bending assay を行った。その結果、cPD1 を加えた時より iPD1 を加えた

時のほうが bending の角度が緩和されたことから、この構造変化が転写活性に寄与していると推定された。

第4章では、TraA のさまざまな欠損体を調製し、 ^3H cPD1 に対する結合活性および DNA 結合活性について解析している。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たことから、ほぼ分子全体が機能を発揮するのに必要であることがわかった。

第5章では、供与菌に cPD1 を添加して、添加前と添加後の菌体における *ipd* および *traA* の転写解析を行った。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。*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る解析からこれらはほぼ同じ点から転写が開始されていることがわかった。

第6章では 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* で転写解析を行っている。*E. faecalis* の菌体から 3 段階の精製過程を経て得られた RNA polymerase 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* 転写を行ったところ、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、本論文は腸球菌 *E. faecalis* のプラスミド pPD1 供与菌における性フェロモン cPD1 のシグナル伝達系における初期応答反応を詳細に調べ、その中心的役割を果たしている TraA の転写調節機構について新たな知見を提供したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の論文として価値あるものと認めた。