

## 連鎖球菌プラスミドにコードされた自己・非自己の認識機構に関する研究

Studies on self or non-self recognition system encoded by *Enterococci* plasmid

代表研究者 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻助手 中山二郎  
Instructor, Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of  
Agriculture and Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo  
Jiro NAKAYAMA

Bacteriocin plasmid pPD1 in *Enterococcus faecalis* encodes a mating response to a small-peptide sex pheromone, cPD1, secreted from recipient cells. To investigate how a pPD1-harboring donor cell receives pheromone signal, a tritiated pheromone, [<sup>3</sup>H]cPD1, was synthesized which was fully active in a bioassay. Trace experiment with [<sup>3</sup>H]cPD1 suggests that the binding molecule exists in cytosol of donor strain. Gel permeation chromatography analysis and scatchard analysis showed that molecular weight, dissociate constant (kd), and binding site per cell (Bmax) of the binding molecule is 30,000 Da, 0.35 nM, and 100, respectively. Site-directed mutageneses on tra genes revealed that the TraC protein is localized in cell wall of donor cells and plays a role in the pheromone binding protein such that it facilitates the permeation through the cell wall, and that the TraA protein is the binding molecule which functions as a pheromone receptor. Competitive inhibition analysis of [<sup>3</sup>H]cPD1-binding with cold iPD1 and cAD1 indicates that iPD1 is an antagonist for the TraA protein and cAD1 dose not bind to the TraA protein.

### 研究目的

多剤耐性菌の出現は臨床上的のみならず社会的にも深刻な問題である。接合伝達性プラスミドはその薬剤耐性蔓延の中心的役割を担っており、このプラスミドの伝播のメカニズムは多くの科学者の注目するところである。腸内常在の連鎖球菌 *Enterococcus faecalis* に存在するある種のプラスミドは、プラスミド受容菌の分泌する性フェロモンにより、その伝達頻度を千倍以上に高めるという独特な接合伝達機構をコードしている。この種のプラスミドは、薬剤耐性以外に溶血性等の病原性をコードしているものもあり、院内感染患者から多く発見される。性フェロモンに応答するプラスミドは多種類（現在約20種類が発見されている）存在する。性フェロモンはそれらに対しほぼ一対一で存在し、対応するプラスミドのみを特異

的に活性化させる。プラスミド非保持の *E. faecalis* は、すべての種のフェロモンを分泌し、プラスミドが伝達されると、それに対応するフェロモンの生産を見かけ上停止し、そのプラスミドに対しては受容菌として行動しなくなる。つまり性フェロモンは、同種プラスミドを保持しない細菌にのみプラスミドが伝達するように自己・非自己を識別するための化学シグナルとして機能している。近年の研究により、プラスミドにはその化学シグナルを有効に利用し自己を繁栄させるべく巧みなシステムがコードされていることが示唆されている。これらのシステムを分子レベルで解明することにより、病原性プラスミドや薬剤耐性プラスミドの蔓延を防ぐための基礎科学的知見を与えることがで

きると期待する。またプラスミドという非常に小さな遺伝子サイズの中での、このような自己・非自己の認識機構の研究は、大きな遺伝子サイズの生物のモデルシステムともなると考えられる。プラスミドにコードされる性フェロモンを介しての自己・非自己の認識機構のシステムとしては、フェロモンインヒビター、フェロモンシャットダウン、フェロモンレセプター等の存在が示唆されている。フェロモンインヒビターは性フェロモンの活性を拮抗的に阻害するペプチドである。フェロモンシャットダウンは性フェロモンの生産を抑制するタンパク質である。両者とも宿主染色体にコードされる性フェロモンの作用を抑える役目を果たす。つまりプラスミド保持菌においては、この二つのシステムにより自己のプラスミドに対応するフェロモンの働きはマスクされ、同種プラスミドを保持する細菌にはフェロモンシグナルを送ることができなくなる。フェロモンインヒビターはその化学構造、遺伝子構造とも既に判明しており、作用機構もフェロモンに対するアンタゴニストと判明している。一方、フェロモンシャットダウンに関しては遺伝子のクローニングは成功しているが、作用機構に関しては全く判明していない。フェロモンレセプターは受容菌の分泌する数種類のフェロモンの中から自己のプラスミドに対応するフェロモンシグナルを特異的かつ高感度に認識し、プラスミド伝達に必要な一連の接合伝達の機構を誘起させるためにプラスミドにコードされていると考えられている分子である。しかしその実体は全く不明であった。本研究においては、フェロモンシャットダウンとフェロモンレセプターの二研究を計画していたが、ここでは成果の挙げたフェロモンレセプターの研究について報告する。

#### 研究経過

##### 1. ラベルフェロモン $[^3\text{H}]c\text{PD1}$ の合成

受容菌から分泌されたフェロモンがどのように供与菌のリセプターに作用するかを調べるた

めに、まずフェロモンのラジオリベルを作成した。フェロモンはその構造が非常に厳格に認識されているために、ペプチドの修飾やアミノ酸の置換等はその活性を激減させる。そこで本研究では、フェロモンペプチドのロイシン残基をデヒドロロイシンに置換したものをまず合成し、このペプチドをトリチウムガス存在下で接触還元し、トリチウム化性フェロモンを得た。このトリチウム化フェロモン( $[^3\text{H}]c\text{PD1}$ )は、当然のことながら本来の性フェロモン $c\text{PD1}$ と同等のフェロモン活性を示した。放射比活性は $361\text{Ci}/\text{mmol}$ であった。

##### 2. フェロモン結合分子の追跡

最初に $[^3\text{H}]c\text{PD1}$ と生菌との相互作用を観察した(表1)。供与菌は $[^3\text{H}]c\text{PD1}$ を急速に吸収した。菌体に吸収された放射活性は20分あまりで最高に達していた。この $[^3\text{H}]c\text{PD1}$ の吸収は4℃でも37℃でも同様であった。一方、受容菌によるラベルフェロモンの吸収は観測されなかった。次に、このラベル $c\text{PD1}$ と生菌をリゾチームで処理したスフェロプラストとの結合を生菌の場合と同様に調べた(表1)。スフェロプラストは生菌以上にフェロモンを結合した。このことは、細胞壁がフェロモンが細胞に作用するのに障壁になっているためと考えられる。次に供与菌細胞膜画分のフェロモン結合能を調べた。しかし供与菌細胞膜画分には有意なフェロモン結合能は観測されなかった。一方、細胞質画分のフェロモン結合能を平衡透析法により調べたところ強いフェロモン結合能が観測された(表1)。以上のことから、フェロモンは細胞内に存在する分子に特異的に結合することが判明した。またさらに、この細胞質結合分子をゲル濾過により分析した結果、分子量約3万と推定された。供与菌スフェロプラストと $[^3\text{H}]c\text{PD1}$ を用いてのスキッチャード解析より、このフェロモン結合分子の解離定数は $0.35\text{ nM}$ で、一細胞あたり約百の結合サイトが存在すると推定された。

3. *Tra* 遺伝子破壊株および *Tra* 遺伝子形質転換株におけるフェロモンの取り込み(表1)

プラスミド pPD1 上の *Tra* 遺伝子が破壊された変異プラスミドを保持する菌体の生菌及びスフェロプラストのラベルフェロモンの結合能を調べた。*traC* 欠損のプラスミド保持株の生菌のフェロモン吸収能は野生株の約 3 分の 1 程度であった。しかしスフェロプラストのフェロモン結合能は野生株同様であった。この *traC* 欠損株はフェロモンに対する感受性が 4 分の 1 程度に低下しているフェノタイプを示す。また *TraC* タンパク質のアミノ酸配列は、他種細菌のオリゴペプチド結合タンパク質とホモロジーを持つ。以上のことより、*TraC* タンパク質はフェロモン結合タンパク質として細胞壁に存在し、細胞外から来るフェロモンをまず最初に受け取っている物と思われる。しかし *traC* 遺伝子領域を多コピーのシャトルベクター pDL276 に組み込んだプラスミド pDLES23 の形質転換株は生菌およびスフェロプラストともに全くフェロモン取り込み能を示さないことから、*TraC* タンパク質はフェロモンが細胞壁を透過するのを容易にしているだけで *TraC* タンパク質自身はフェロモン保持能を持たないと推測される。

*traA* 欠損プラスミド保持株は、生菌およびスフェロプラストともに [<sup>3</sup>H]cPD1 の結合能が欠失していた。この *traA* 変異株はフェロモンによる誘導が無くても恒常的に凝集起こす他、逆にフェロモン誘導時でもプラスミドを伝達しないというフェロモンに対する応答の制御が破壊されている表現型を示す。これらの事実も併せて考えると、*TraA* タンパク質はフェロモン結合能とフェロモンシグナリングの両機能を持つ分子で、すなわちフェロモンレセプターであるということが示唆される。*traA* の遺伝子をシャトルベクター pDL276 に挿入した pDLHH21 を *E. faecalis* に形質転換したものは、スフェロプラストにおいて高いフェロモン結合活性を示した。またこの形質転換株の細胞質抽出物も高いフェロモン結合能を示した。以上のことから、*TraA* タン

パク質は細胞内に存在するフェロモンレセプターであるということが強く示唆された。*traA* 遺伝子の塩基配列から予測される *TraA* タンパク質のアミノ酸配列にはシグナル配列や膜貫通配列などは存在せず、この事実と *TraA* タンパク質が細胞質内に存在することを指示する今回の実験結果は矛盾しない物である。

#### 4. 種々コールドペプチドによるラベルフェロモン結合の競合阻害実験

供与菌のプラスミドにコードされるフェロモンインヒビター iPD1 は cPD1 と同様に [<sup>3</sup>H]cPD1 の供与菌プロトプラストに対する結合を阻害した。このことから、インヒビターはフェロモンのフェロモン結合を競合的に阻害しているペプチドであることが示唆された。一方、他のプラスミド pAD1 に対する性フェロモン cAD1 は、全くラベル cPD1 の結合を阻害しなかった。このことより、性フェロモンレセプターはフェロモン種特異的であるということが判明した。

#### 研究成果

本研究より腸球菌における性フェロモンの受容認識機構のモデルが図1のように作成された。受容菌により分泌されたフェロモンは、*TraC* タンパク質の助けをかりて細胞壁を通過し、次に何らかの機構により膜を透過し、細胞質内へと移行する。Tanimotoらの研究から *TraA* タンパク質は DNA 結合能を持つことが示されているが、そのことも併せて考えると、*TraA* タンパク質はフェロモン非存在下では細胞の凝集塊形成を導く凝集物質の遺伝子発現をプロモーター領域に結合することにより抑制しているおり、フェロモンが結合すると DNA から離れ遺伝子発現抑制が解除され凝集物質が発現されるというモデルが考えられる。同時に、*traA* 欠損株がプラスミド伝達能を持たないということから、フェロモンが結合した *TraA* タンパク質はプラスミド伝達に機能する別の遺伝子のプロモーターに作用し、発現を誘起するように働くというモデルも考えられる。

今後の課題と発展

フェロモンはそれらのプラスミドに一对一の関係で存在し、プラスミド供与菌は、構造の似かよった性フェロモンペプチドを厳格に区別して認識している。本研究では、性フェロモン応答性プラスミドの一種 pPD1 にコードされるフェロモンレセプター *TraA* タンパク質が同定されたが、これらの他種プラスミドにも *TraA* タンパク質に相当するものが存在するはずである。今後は、それらのフェロモンレセプターとフェロモン間の特異性を、ペプチド-タンパク質間の相互認

識機構を分子構造レベルで研究することにより解析したいと考えている。フェロモン応答性のプラスミドは現在でも次々と発見されており、将来的には、フェロモンペプチドとプラスミドコードのタンパク質の無数の組み合わせが、実験材料として提供されることが予測される。そしてその多種類のフェロモンで研究を進めることにより、ペプチド、タンパク質間の相互認識機構の普遍的な法則を見いだせることが期待される。それらの基礎的知見は、他の分野の研究、例えばタンパク質工学などにも価値ある情報となることが期待できる。

発表論文リスト

1. J. Nakayama, K. Yoshida, H. Kobayashi, A. Isogai, D. B. Clewell, and A. Suzuki. 1995. Cloning and characterization of a region of *Enterococcus faecalis* plasmid pPD1 encoding pheromone inhibitor (*ipd*), pheromone sensitivity (*traC*), and pheromone shutdown (*traB*) genes. *J. Bacteriol.* 177: 5567-5573.

表1 種々菌株におけるラベルフェロモンの結合

Strain	Plasmid genotype	Phenotype relevant to pheromone response	Specific binding of [ <sup>3</sup> H]cPD1 (pmol/ml)		
			Intact cell	Spheroplast	Cell free
OG1X	no plasmid		0.283	-0.542	-0.370
OG1X(pAM351)	pPD1	responsive to cPD1	2.239	7.492	8.137
OG1X(pAM351CM)	pPD1Δ <i>traC</i>	less sensitive to cPD1	0.786	9.575	not tested
OG1X(pAM351AIM)	pPD1Δ( <i>traA-ipd</i> )	insensitive to cPD1	0.197	-0.014	not tested
OG1X(pDLHH21)	pDL276:: <i>traA</i>	not tested	4.095	13.922	24.977
OG1X(pDLHH21X)	pDL276:: <i>traA0</i>	not tested	-0.016	0.083	0.640
OG1X(pDLES23)	pDL276:: <i>traC</i>	not tested	0.222	0.083	not tested

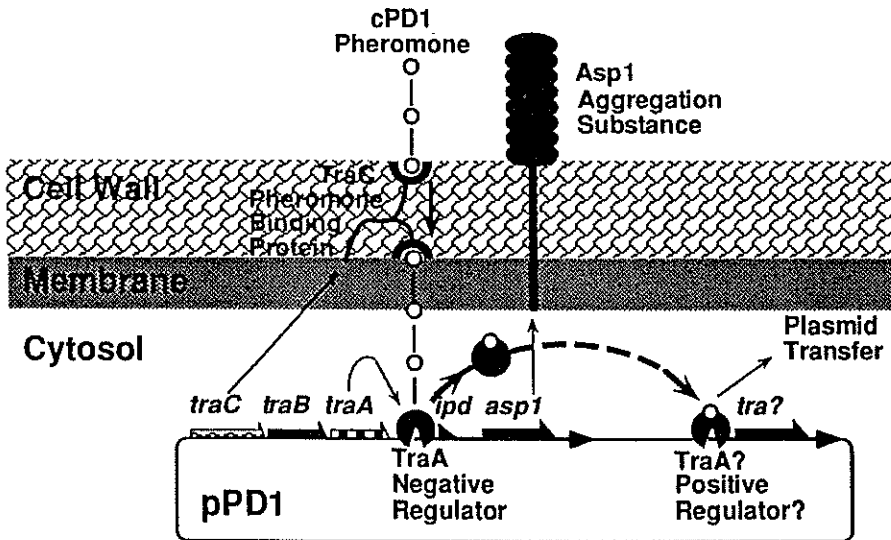


図1 連鎖球菌プラスミドにコードされる性フェロモンシグナルの認識機構のモデル