

# φ X174 ファージ感染を司るスパイク H タンパク質の機能と構造

平成 17-19 年度科学研究費（基盤研究 C）実績報告書

（研究課題番号 17510177）

平成 20 年 6 月

研究代表者 稲垣 穰

（三重大学生物資源学研究科 准教授）

平成 17-19 年度科学研究費  
(基盤研究 C)

研究成果報告書

課題番号 17510177

研究課題

φ X174 ファージ感染を司るスパイク H タンパク質の機能と構造

平成 20 年 6 月

研究代表者 稲垣 穰

(三重大学生物資源学研究科 准教授)

## はしがき

バクテリオファージ  $\phi$ X174 は、1964 年に Sinsheimer らによって同定された最も単純なウイルスの一つで、直径約 25 nm の正 20 面体構造をしたウイルスの一つである。 $\phi$ X174 の属するマイクロウイルス科のウイルスは、大腸菌やサルモネラ菌、一部の赤痢菌などの腸内細菌科のバクテリアのラフ型に選択的に好んで感染する。こうした腸内細菌の間は、菌体の表層がリポ多糖と呼ばれるグラム陰性菌に特徴的な糖脂質で覆われており、マイクロウイルスは、そのリポ多糖の R-コアと呼ばれる糖鎖部分に含まれる多種類の糖とその結合位置の取り合わせを精緻に認識して、感染するべく宿主細胞を選択している。このことが金ヶ崎や Lindberg らによって 1970 年代に解明されて以降、このウイルスに対する注目度は、次第に薄れてゆき、あまり研究されなくなっていた。カリフォルニア工科大学の林多紀教授が、“複雑なウイルスは、複雑だが、単純なウイルスは、単純でない”と彼の  $\phi$ X174 の研究著書に記しているように、わずか 4 種類のタンパク質と 1 本の環状一本鎖 DNA で構成される  $\phi$ X174 が具体的にどのようにして宿主を見分けているか？ T4 ファージの様にあからさまに遺伝子を注入する尾を持たないが、如何にして遺伝子を宿主菌に送り込んでいるのか？は、不明なまま長い年月が経過した。

著者らは、この  $\phi$ X174 には、単純であるからこそ、生化学における重要研究課題である、ウイルスによる宿主認識に関する普遍的な仕組みが存在するのでは、ないかと思ひ、 $\phi$ X174 の宿主大腸菌の認識メカニズムを分子レベルで解明することを目標に研究を続けてきた。

研究は、まず、合成化学出身である著者が  $\phi$ X174 の自然宿主である、大腸菌 C 株のリポ多糖の非還元末端に対応する 5 糖を合成することから始めたが、非常に立体的に混み合った  $\alpha$  結合が多く、合成はなかなか難しかった。しかし、大腸菌 C 株を大量に培養して、そこからグラムスケールでリポ多糖を取得する方法を確立できたことがブレイクスルーとなって、 $\phi$ X174 の外被(カプシド)を構成するタンパク質との相互作用を解析する方向に発展させることが出来た。

$\phi$ X174 の正 20 面体の 12 箇所の頂点には、スパイクと呼ばれるタンパク質の突起が付きだしており、それは、5 分子の G タンパク質と 1 分子の H タンパク質で構成されている。これまで、著者らは、このスパイクに含まれる二つのタンパク質 (G と H) をクローニングし、大腸菌で多量発現することによって、純粋なタンパク質として単離し、これらのタンパク質が宿主大腸菌のリポ多糖と強く結合することを証明した。しかも、これらスパイクタンパク質は、リポ多糖と結合する事によって、円偏光二色性スペクトル明らかに判るほど大きな立体構造変化を起こすことも判り、リポ多糖を認識して、立体構造を変えることで、遺伝子放出のためのスイッチが入ると考えるようになった。

1994 年には、McKenna らによって、 $\phi$ X174 粒子の X 線構造が発表された。F タンパク質が 60 個集まって、正 20 面体を作り、G タンパク質 5 量体は、マッシュルームの様な形で、12 箇所の頂点にかなり大きく付きだした構造が明らかになった。しかし、スパイク H タンパク質は、電子密度が分散しており、その位置や構造が解けなかった。H タンパク質は、 $\phi$ X174 が DNA を放出する際に、DNA と一緒に宿主菌体に挿入されると考えられており、ますます、H タンパク質の機能と感染における役割に興味を湧いた。本研究課題“ $\phi$ X174 ファージ感染を司るスパイク H タンパク質の機能と構造解析”は、構造が解明されていない H タンパク質の機能をタンパク質科学的に解明することを目指して計画した物であり、1) H タンパク質のリポ多糖認識ドメインの推定、2) 構造解析を目指した結晶化の試み、3) トリプトファン残基の機能解析 を柱とする研究計画である。これらの目的を実現するに辺り、周辺技術の確立やその準備のための実験なども多く行ひ、これらに関して論文発表や学会発表なども行ったので、以下に報告する。

## 研究組織

研究代表者 稲垣 穰（三重大学生物資源研究科 准教授）

年度	金額単位（千円）		
	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	1,000	0	1,000
平成18年度	500	0	500
平成19年度	500	150	650
総計	2,000	150	2,150

## 研究発表

### (1) 雑誌論文

Minoru Inagaki, Hitohito Wakashima, Muneharu Kato, Koji Kaitani, Shiro Nishikawa (2005).  
Crucial role of the lipid part of lipopolysaccharide for conformational change of minor spike H protein of bacteriophage  $\phi$ X174.  
*FEMS Microbiol. Lett.*, **251** (2), 305-311.

### (2) 学会発表

日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006) 京都  
バクテリオファージ  $\phi$ X174 スパイクタンパク質 5 量体の調製および大腸菌リポ多糖との相互作用解析

○大江健介, 稲垣 穰, 荻田修一, 川浦知子, 西川司朗

日本農芸化学会 2006 年度大会 (2006) 京都  
サルモネラ菌 LPS の糖鎖部分と  $\phi$ X174 ファージスパイクタンパク質の相互作用における非還元末端残基の寄与

○富田剛史, 稲垣 穰, 山根章宏, 若嶋裕人, 西川司朗

大阪大学タンパク質研究所セミナー

バクテリオファージ研究の新たな方向と応用, 2006 年 9 月 14-15 日, 大阪大学 (吹田)

招待講演:バクテリオファージ  $\phi$ X174 の宿主認識機構

○稲垣 穰

第 15 回内毒素・LPS 研究会, 2006 年 6 月 24 日, 順天堂大学 (東京)

招待講演:バクテリオファージ  $\phi$ X174 のリポ多糖認識と感染機構

○稲垣 穰

日本農芸化学会第 148 回中部支部例会 若手シンポジウム (2006) 津

大腸菌ウイルス  $\phi$ X174 の感染機構の研究

○稲垣 穰

日本農芸化学会 2007 年度大会 (2007) 東京

バクテリオファージ  $\phi$ X174 スパイク H タンパク質とファージ ssDNA の相互作用解析

吉永安寿, ○稲垣 穰

日本農芸化学会 2008 年度大会 (2008) 名古屋

バクテリオファージ  $\phi$ X174 カプシド F タンパク質と宿主菌リポ多糖の相互作用

○稲垣 穰, 関口 学, 荻田修一

(3) 図書

Minoru Inagaki, Motoko Kazusa, Tomoe Hamano, Hisaki Kojima, Muneharu Kato (2008 in press).  
Contribution of negatively charged phosphate and KDO residues on lipopolysaccharide to the binding and conformational change of spike G and H proteins of bacteriophage  $\phi$ X174.  
*Contemporary Trends in Bacteriophage Research*, Nova Science Publisher, Hauppauge, NY, USA.

(4) 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

バクテリオファージ由来スパイク G タンパク質 5 量体及びその製造方法. (2006).  
日本公開特許願, 2006-240117.  
稲垣 穰, 大江健介

# 目次

- 1 はじめに
- 2 スパイク H タンパク質の認識にリポ多糖の脂質部分の寄与  
脱アシルリポ多糖誘導体の調製  
スパイク H タンパク質と脱アシル誘導体の相互作用解析  
スパイク H タンパク質の立体構造変化におけるリポ多糖部分構造の寄与
- 3 スパイク H タンパク質の結晶化条件の検討
- 4 スパイク H タンパク質のリポ多糖認識ドメインの特定  
プロテアーゼ耐性ドメインの取り出し  
プロテアーゼ消化断片の特定  
プロテアーゼ耐性ドメインのリポ多糖認識能
- 5 スパイク H タンパク質によるリポ多糖認識におけるトリプトファン残基の機能解析  
H タンパク質野生型および変異型タンパク質の調製  
H タンパク質とリポ多糖の相互作用  
H タンパク質変異体とリポ多糖の相互作用
- 6 スパイクタンパク質 H と G によるリポ多糖認識におけるリポ多糖中の負荷電残基の寄与  
脱リン酸および KDO 還元リポ多糖誘導体の調製  
負荷電残基を削減したリポ多糖誘導体とスパイク H および G タンパク質の相互作用
- 7 バクテリオファージ由来スパイク G タンパク質 5 量体及びその製造方法
- 8 謝辞