

2010 年度（平成 22 年度） 修士学位論文

**HPLC を用いるリポ多糖多型成分の分離と  
 $\phi$ X174 スパイクターパク質との相互作用解析**

三重大学 生物資源学研究科 生物圏生命科学専攻  
生命機能科学講座 生理活性化学教育研究分野

内田 智子

## 目次

### 第一章 緒論

- 第一節 バクテリオファージ  $\phi$ X174 について ..... 1
- 第二節 リポ多糖について ..... 5
- 第三節 本研究の背景と目的 ..... 7

### 第二章 LPS 脱アシル化誘導体の調製

- 第一節 LPS の *O,N*-脱アシル化 ..... 11
- 第二節 LPS の脱リン酸化 ..... 11
- 第三節 LPS の弱酸加水分解 ..... 12
- 第四節 結果および考察 ..... 12

### 第三章 ヒスチジンタグ融合 F タンパク質 (HisF) の遺伝子工学的調製と精製

- 第一節 pQE-Fu による大腸菌の形質転換とタンパク質発現 ..... 17
- 第二節 Ni-NTA カラムによる HisF の精製 ..... 18
- 第三節 DEAE セルロファインカラムによる HisF の精製 ..... 19
- 第四節 エタノール沈殿法による HisF の精製 ..... 20
- 第五節 透析による HisF の精製 ..... 20
- 第六節 結果および考察

- 第一項 pQE-Fu による大腸菌の形質転換とタンパク質発現 ..... 21
- 第二項 Ni-NTA カラムによる HisF の精製 ..... 22
- 第三項 DEAE セルロファインカラムによる HisF の精

製 .....	24
第四項 エタノール沈殿法による HisF の精製 .....	27
第五項 透析による HisF の精製 .....	28
第四章 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた脱アシル化 LPS の分離および分子種の同定	
第一節 陰性電荷に基づく分離モードによる脱アシル化 LPS の分析方法の検討 .....	30
第二節 結果および考察	
第一項 HiTrapQ カラムを用いる強塩基性陰イオン交換クロマトグラフィーによる大腸菌 C 株 PS、deON、deP deON の分析結果 .....	33
第二項 Partisil カラムを用いる強塩基性陰イオン交換クロマトグラフィーによる大腸菌 C 株 PS、deON、deP deON の分析結果 .....	38
第三項 Symmetry カラムを用いる逆相イオンペアクロマトグラフィーによる大腸菌 C 株 PS、deON、deP deON の分析結果 .....	43
第四項 その他脱アシル化 LPS の分析結果 .....	46
第五章 HPLC を用いた脱アシル化 LPS とファージタンパク質との相互作用解析	
第一節 遠心限外濾過を用いた脱アシル化 LPS とファージタンパク質との相互作用解析 .....	51
第二節 結果および考察	
第一項 線形フィッティングによる相互作用解析 .....	52

第二項	大腸菌 C 株 deON および PS における相互作用解析 .....	54
第三項	その他脱アシル化 LPS の相互作用解析結果	61
第六章	総括 .....	64
第七章	実験の部	
第一節	LPS の O,N-脱アシル化 (deON の調製) .....	70
第二節	LPS の脱リン酸化 (deP deON の調製) .....	72
第三節	LPS の弱酸加水分解 (PS の調製) .....	72
第四節	pQE-Fu による大腸菌の形質転換とタンパク質発現 .....	73
第五節	Ni-NTA カラムによる HisF 可溶性画分の精製	75
第六節	Ni-NTA カラムによる HisF 不溶性画分の精製	76
第七節	DEAE セルロファインカラムによる HisF の可溶性画分の精製 .....	77
第八節	DEAE セルロファインカラムによる HisF の不溶性画分の精製 .....	78
第九節	エタノール沈殿法による HisF の精製 .....	79
第十節	透析による HisF の精製 .....	80
第十一節	高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた脱アシル化 LPS の分離 .....	81
第十二節	HPLC を用いた脱アシル化 LPS とファージタンパク質との相互作用解析 .....	82
謝辞	.....	83
参考文献	.....	84

## 略語表

LPS	lipopolysaccharide
deON	<i>O,N</i> -脱アシル化 LPS
deP deON	脱リン酸 <i>O,N</i> -脱アシル LPS
PS	LPS の弱酸加水分解物
HisF	N 末端ヒスチジンタグ融合 F タンパク質
Ni-NTA	Ni-nitrilotriacetic acid
DEAE	diethylaminoethyl
cHisG	C 末端ヒスチジンタグ融合 G タンパク質
HisH	N 末端ヒスチジンタグ融合 H タンパク質
NaPB	ナトリウムリン酸緩衝液

## 第一章 緒論

人間の生命や健康を脅かすもののひとつにウイルスが挙げられる。ウイルスとは、遺伝子とそれを保護するタンパク質から成る最も小さな有機体であり、細胞質や代謝経路を持たないため、自己増殖することができない。そこで、ウイルスは特異的な宿主細菌に感染し、その宿主細菌の増殖機能を利用して増殖する。しかし、この一連の感染機構には解明されていない点が多いため、当研究室ではバクテリオファージ  $\phi$ X174（以下  $\phi$ X174 とする）をモデルウイルスとし、感染機構の初期メカニズムを解明することに取り組んでいる。

### 第一節 バクテリオファージ $\phi$ X174 について

$\phi$ X174 は、ミクロウイルス科 (*Microviridae*) に属するウイルスの一種であり、直径約 26 nm の正 20 面体構造である。各頂点にはスパイクと呼ばれる突起を持ち、内部には 5386 塩基の一本鎖環状 DNA (single-stranded circular DNA ; SS-DNA) を持つ、分子質量  $6.2 \times 10^6$  Da のウイルスである。また、ゲノムの塩基配列が解読された最初の有機体でもある<sup>1-5)</sup>。全ゲノムの半分強が、外殻であるカプシドを構成するタンパク質をコードする F、G、H、J 遺伝子で占められている<sup>6-8)</sup>。そして、 $\phi$ X174 は、このカプシドタンパク質と、

DNA から構成された非常に単純な構造をしていることが知られている<sup>1-5)</sup>。

$\phi$ X174 のウイルス粒子は、それぞれ 60 分子の F、G、J タンパク質と、12 分子の H タンパクで形成されている (Figure 1-1)<sup>9-11)</sup>。F タンパク質は、 $\phi$ X174 の外殻を形成し、J タンパク質は、ファージ粒子の内部で一本鎖 DNA と結合し、DNA 鎖を折り畳むパッキングを担っている。H タンパク質と G タンパク質は、感染に必要なスパイクを形成している。このスパイクは、中心に存在する 1 分子の H タンパク質とその周囲を取り囲むように存在する 5 分子の G タンパク質で形成されている (Figure 1-2)<sup>9,12-13)</sup>。 $\phi$ X174 は、このスパイクを利用し、宿主細菌の外膜に存在するリポ多糖 (LPS) を認識し感染する。その際、G タンパク質は親水性チャネルとして、H タンパク質は DNA を挿入するパイロットタンパク質として働くと考えられている (Table 1-1)<sup>14-15)</sup>。

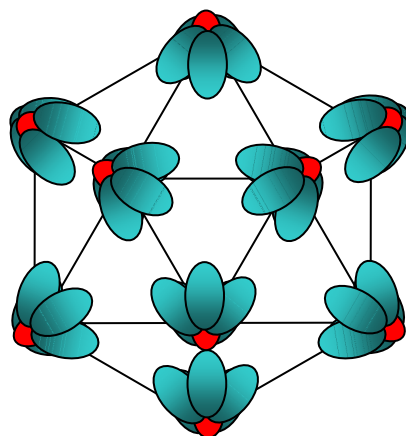


Figure 1-1  $\phi$ X174 の模式図

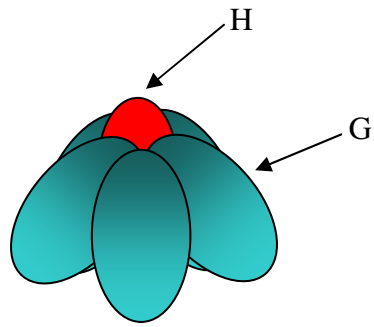


Figure 1-2  $\phi$ X174 のスパイクの模式図

Table 1-1  $\phi$ X174 の構成タンパク質

タンパク質	分子量 (kDa)	1粒子に 含まれる数	機能
F	48.4	60	カプシドを形成
G	19.0	60	DNA を通すチャンネル LPS の認識
H	34.4	12	DNA の挿入 LPS の認識
J	4.2	60	DNA のパッケージング F と DNA の橋渡し

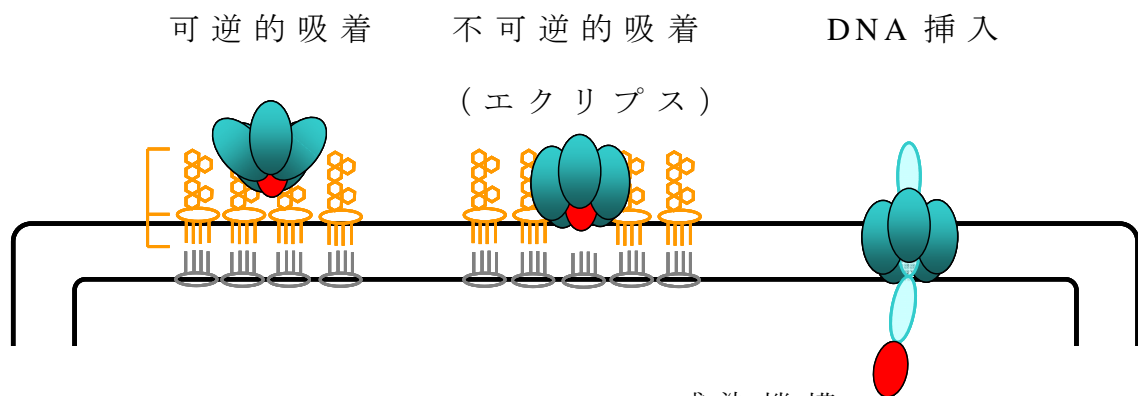


Figure 1-3  $\phi$ X174 の感染機構



$\phi$ X174 は、感染する際にスパイクを使用して宿主細菌の外膜表面に存在する LPS を認識し、可逆的に吸着する。つぎに、F、G タンパク質の高次構造の変化を伴い、不可逆的に吸着するエクリップス状態となる<sup>16-17)</sup>。このとき、ファージ DNA と H タンパク質の一部が、G タンパク質の形成するチャンネルを通して放出され、カプシドの立体構造が変化するため、ファージは感染力を失うことになる。その後、H タンパク質をパイロットタンパク質として一本鎖環状 DNA が宿主菌体に挿入され、感染を果たすと知られている (Figure 1-3)。感染すると、宿主の生合成系を利用して DNA やタンパク質を合成し、溶菌して増殖を完了する。このとき、 $\phi$ X174 はエンベロープ (包膜) を持たないため、宿主レセプターである LPS に直接結合し、カプシドタンパク質に構造変化が起こる。その結果、菌体表面にファージ DNA が通れるような孔を形成し、DNA を菌体内に挿入すると考えられている<sup>18)</sup>。

また、 $\phi$ X174 は、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) のラフ型菌で R-コア糖鎖が完全に保たれている Ra 型の LPS を発現している株を良好な宿主として選択する<sup>19-20)</sup>。しかし、Ra 型であっても大腸菌 K-12 株は宿主として選択されないため、ただ単純に糖鎖長だけを認識しているわけではないと考えられている。

## 第二節 リポ多糖について

リポ多糖（LPS）は、グラム陰性細菌外膜の主要構成成分である。グラム陰性細菌は、細胞質膜およびペプチドグリカン層の外側に LPS、リン脂質、外膜タンパク質で構成される外膜を持っている<sup>21-23)</sup>。LPS は外膜表面に存在し、脂質部分をアンカーとして外膜内に埋め込み、糖鎖部分を細胞外に突き出した状態で存在している。そして、LPS に存在しているリン酸残基は、Ca<sup>2+</sup>などの二価の陽イオンを共有することにより架橋を形成し、LPS 分子の外膜を強くすることで、外界からの物理化学的変化から細胞を保護している<sup>24)</sup>。また、正電荷をもつ抗生物質に対して抵抗性のある菌の LPS では、エタノールアミンが増加するという報告もある<sup>25-26)</sup>。

LPS は、β-1,6 結合したグルコサミン 2 糖に結合した脂肪酸から成るリピド A と、KDO（3-デオキシ-D-マンノオクトロソン酸）や Hep（L-グリセロ-D-マンノヘプトース）などの糖鎖からなる R コア、さらに、菌の抗原性を担う糖鎖の繰り返し単位である O-抗原多糖から構成されている<sup>21-22)</sup>。糖鎖長の違いにより、スムーズ型、ラフ型、セミラフ型に分類される<sup>21,27-28)</sup>。スムーズ型は O-抗原多糖を持つ菌株、ラフ型は O-抗原多糖を持たない菌株、セミラフ型は O-抗原多糖の繰り返し単位をひとつだけ持つ菌株を指す。ラフ型の菌株はさらに分類され、R コア糖鎖を完全に持つものを

Ra 型、非還元末端から糖鎖が欠損するにつれて、Rb、Rc、Rd、Re 型と呼ばれる。また、菌種や菌株により、O-抗原多糖や R コア糖鎖を構成する糖残基の種類や糖鎖長などが異なるのに対し、リポド A は腸内細菌科の菌株間で比較的よく保存されていることから、LPS の生物活性の活性中心と考えられている<sup>21)</sup>。

LPS を扱う際は、LPS の物理的・化学的不均一性に注意しなければならない<sup>21)</sup>。たとえば、サルモネラ菌は、ラフ型菌の Ra~Re 型など糖鎖長の異なる株が存在することが知られている (Figure 1-4)。

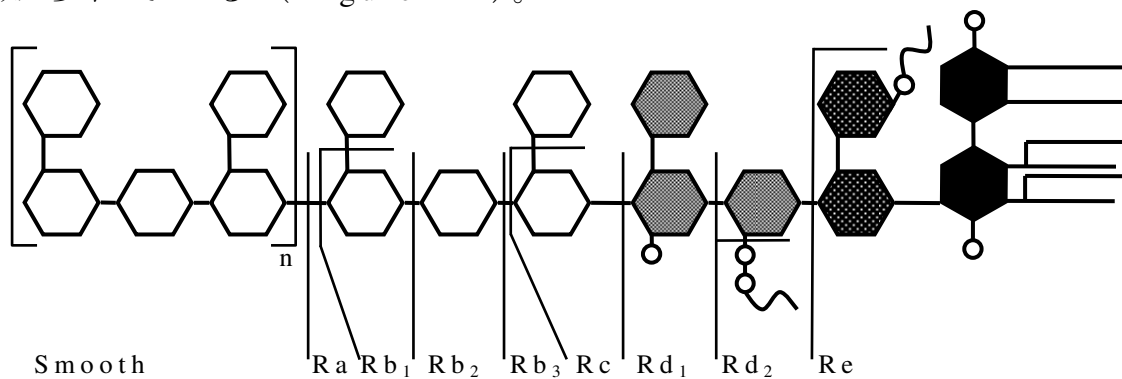


Figure 1-4 サルモネラ菌の LPS の模式図

また、菌株の種類や環境、培地、温度などにより、非定量的置換基（リン酸残基やエタノールアミン残基）の数が異なる LPS が作られる性質がある。非定量的置換基数の例として、O,N-脱アシル LPS (deON) には 4~5 つのリン酸残基がエステル結合している菌株が含まれていることが知られている。しかし、これまでに非定量的置換基に関する研究はそれほど行われておらず、解明されていない点が多い。

以下に、大腸菌 C 株の模式図を示した (Figure 1-5)。点線で示した結合は、切断されやすく、LPS が複数の分子種の混合物として存在する原因ともなっている。

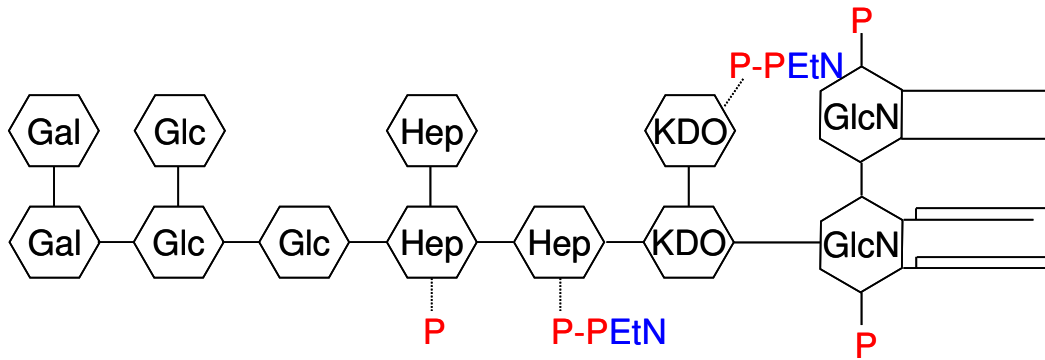


Figure 1-5 大腸菌 C 株の LPS の模式図

### 第三章 本研究の背景と目的

これまで、当研究室では、ファージの宿主認識機構を解明するため、ファージと宿主の双方から様々なアプローチを使って研究を行ってきた。

ファージからのアプローチとしては、遺伝子工学的手法を用いて F タンパク質 (HisF<sup>29</sup>)、G タンパク質 (HisG<sup>14</sup>)、cHisG<sup>30</sup>)、H タンパク質 (HisH<sup>31</sup>) が調製された。G、H タンパク質に関しては、いくつかの変異体も調製され、それらの変異体タンパク質と LPS 誘導体との相互作用が解析されてきた。

レセプターである LPS からのアプローチとしては、R コア糖鎖、リピド A、負電荷の 3 つの部分構造に注目して、その機能を探るという観点からタンパク質との相互作用が

解析された。これにより、感染初期段階の分子レベルでのメカニズムが少しずつ解明されてきている。

大腸菌 C 株の R-コア糖鎖の非還元末端はガラクトース (Gal) であるが、この Gal が欠損した大腸菌 C 株の変異体 LPS は、ファージとの吸着力に関して著しい低下を示した<sup>32)</sup>。この結果から、外部コアの五糖がレセプターとして重要な役割を持っていると考え、この五糖を合成することを目標とし、実験が行われてきた。これまでに、非還元末端から、二糖<sup>33)</sup>、三糖<sup>33)</sup>、四糖<sup>33)</sup>、先端 Gal のない分岐部分の四糖<sup>34)</sup>、及び分岐 Glc を含む先端四糖<sup>35)</sup>の合成に成功しているが、五糖の合成には至っていない。合成された二糖と三糖に対してウイルス粒子を用いたプラーク検定を行った結果、三糖に相互作用が確認された。LPS は、弱酸加水分解により KDO 間で結合が切断されることが知られており<sup>36)</sup>、この処理によって得られる非還元末端から九糖の糖鎖である弱酸加水分解物 (PS) も調製された。PS は、合成された二糖や三糖に比べて、生物検定において、ウイルス粒子とより強い相互作用を示すことが確認されている<sup>33,37)</sup>。

また、LPS の非還元末端側の糖鎖に焦点をあて、R コア糖鎖の配列が同じもので糖鎖長のみが異なる、サルモネラ菌の Ra 型から Re 型までの変異株を用いて相互作用が解析された。その結果、Ra 型への感染率を 100 %にした場合、Rb1 型では 36 %、Rb2 型以降では 0 %となった。これにより、 $\phi$ X174 は非還元末端から 2 残基以上欠損した糖鎖を持つ株

を宿主として選択しないことが確認された<sup>38)</sup>。しかし、これらの変異株の LPS と G タンパク質との相互作用を測定したところ、Ra~Rc までの相互作用に違いが認められず、G タンパク質との相互作用解析からは、Rb2 型以降の菌株に対してファージが感染しないという事実を証明することはできなかった<sup>38)</sup>。さらに、Ra 型である K12 株では、感染しないという結果も得られているため、単に糖鎖長のみを認識しているわけではないことも分かっている。

さらに、脂肪酸鎖を化学的に限定分解した誘導体が調製された。先に述べた LPS、PS に加え、O-脱アシル LPS (deO) と O,N-脱アシル LPS (deON) が調製された。これらの脱アシル化 LPS とスパイクタンパク質との相互作用を測定したところ、脂肪酸鎖を失うことで、スパイクタンパク質との親和性およびスパイクタンパク質の立体構造変化が低下することが明らかになった。このことから、脂肪酸鎖は、可逆的吸着だけでなく、タンパク質の立体構造の変化を伴うエクリップスにも関与していると考えられた<sup>39-41)</sup>。

負電荷からのアプローチとして、LPS に存在するリン酸残基や KDO のカルボキシル基の負電荷を化学的に減少させた誘導体が調製された。それは、脱リン酸 LPS (deP LPS)、KDO 還元 LPS (Red LPS)、脱リン酸 KDO 還元 LPS (deP Red LPS) の 3 種類である。deON に関しても、同様に 3 種類の誘導体が作成され、これらの LPS 誘導体とスパイクタンパク質との相互作用解析が行われた<sup>42-44)</sup>。その結果、負電荷

残基の減少に伴い、スパイクタンパク質との親和性およびスパイクタンパク質の立体構造変化が小さくなることが明らかになった。しかし、リン酸残基の存在する位置が及ぼす影響に関しては、未だわかっていない。

これまでの当研究室の研究では、非定量的置換基数の異なるいくつかの分子種を混合物として使用し、タンパク質との相互作用解析を行ってきた。その結果、負電荷残基の平均数が多い誘導体ほど相互作用が強いという結果が示されてきた。しかし、非定量的置換基数や位置の違いによるそれぞれの分子種ごとの相互作用は解析されていない。そこで、これらの非定量的置換基の役割をより詳しく解析したいと考え、まず HPLC を用いて脱アシル化 LPS の分離を目的とした。さらに、HPLC による脱アシル化 LPS の分離を応用し、各分子種とフェージタンパク質との個々の相互作用を解析することを目的とした。

## 第二章 LPS 脱アシル化誘導体の調製

$\phi$ X174 のスパイクタンパク質との相互作用を測定するため、いくつかの脱アシル化 LPS を調製した。調製した誘導体は、deON (*O,N*-脱アシル LPS)、deP deON (脱リン酸 *O,N*-脱アシル LPS)、PS (Lipid A が欠損した LPS の弱酸加水分解物) である。

### 第一節 LPS の *O,N*-脱アシル化

LPS を蓋付き試験管に取り、水酸化カリウムを用いて、*O,N*-脱アシル化を行った。その後、塩酸を加え中和することにより、脂肪酸の塩を析出させ減圧濾過で除去した。この濾液にジクロロメタンを加え、分液抽出した後、得られた水層に対し、PD-10 カラム (Pharmacia 社) を用いて簡易的なゲル濾過クロマトグラフィーを行った。つぎに、塩を完全に除去するため、Bio-gel P4 medium (BIO-RAD 社) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを行い、得られた糖鎖画分を減圧濃縮した。これを少量の超純水に溶解して凍結乾燥し、*O,N*-脱アシル化 LPS (deON) を得た。

### 第二節 LPS の脱リン酸化

LPS と 48 %フッ化水素酸を別のポリエチレン製容器に入



れ、氷中でよく冷却した。その後、LPS にフッ化水素酸を加え、容器を氷中に入れたまま、4℃で攪拌し、脱リン酸化反応を行った。24 時間後、透析膜（MWCO 1,000）に入れ、4℃で超純水に対して透析した。外液の pH が中性になるまで、適宜外液を交換した。その後、減圧濃縮して溶媒を除去し、再度少量の超純水に溶解して凍結乾燥し、脱リン酸化 LPS（deP LPS）を得た。

### 第三節 LPS の弱酸加水分解

LPS に 1 % (v/v) 酢酸を加え、100℃で 2 時間還流した。放冷した後、反応溶液を遠心分離し、Lipid A を沈殿として除去した。つぎに、塩を除去するため、上清を Bio-gel P4 medium を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供した。得られた糖鎖画分を減圧濃縮した後、再度少量の超純水に溶解して凍結乾燥し、弱酸加水分解物（PS）を得た。

### 第四節 結果および考察

Bio-gel P4 medium を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによる、各種 deON の脱塩結果を以下に示した (Figure 2-1)。

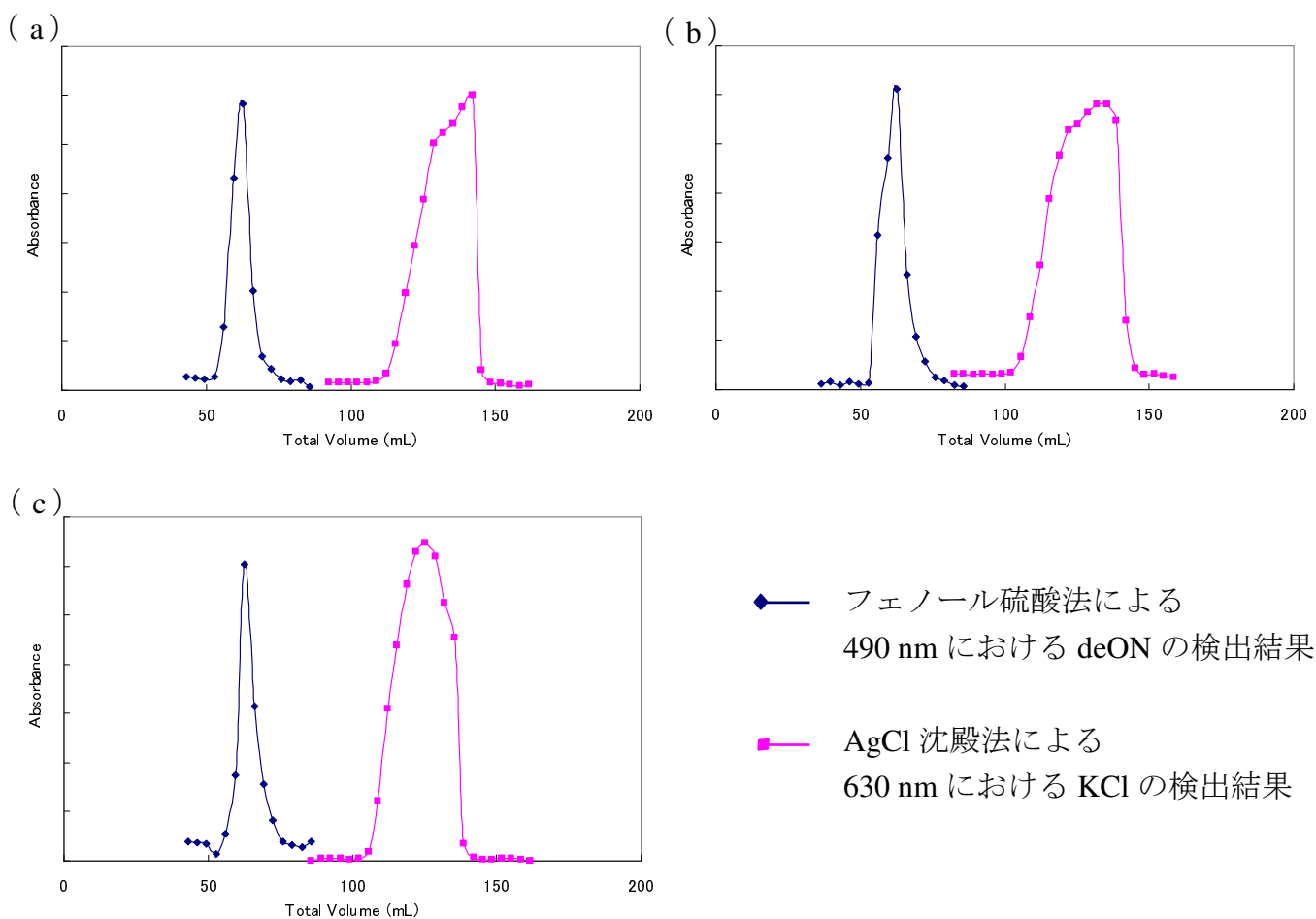


Figure 2-1 Biogel P4 を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによる脱塩結果

(a) 大腸菌 C 株 deON (b) 大腸菌 K12 株 deON

(c) 大腸菌 C 株 dePdeON

3 種の脱アシル化 LPS について、ゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、フェノール硫酸法で検出される糖鎖のピークと AgCl 沈殿法で検出される KCl のピークがはっきりと分かれ、脱塩に成功した。この脱塩操作が質量分析や HPLC などの結果をより良くするために重要な点であった。

deP deON の調製にあたり、脱アシル化した後に脱リン酸化をした場合に比べ、脱リン酸化した後に脱アシル化した場合には、リン酸残基の残存率が高くなることが確認された。これは、フッ化水素酸を加えた際に、脱アシル化体は完全に溶解するのに対し、LPS ではミセルを形成するためにフッ化水素酸との接触が減少することが原因ではないかと考えられた。本研究では、リン酸残基数の異なる多くの分子種を含む脱アシル化 LPS を得たいと考えたため、脱リン酸化した後に脱アシル化を行い、deP deON を得た。

Bio-gel P4 medium を用いたゲル濾過クロマトグラフィー

による、PS の脱塩結果を以下に示した (Figure 2-2)。

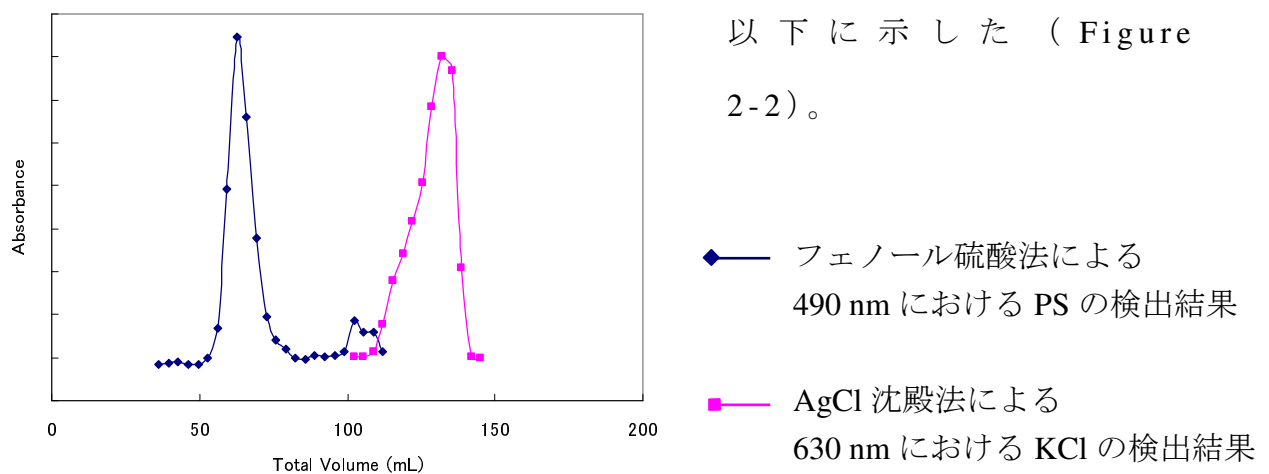


Figure 2-2 Bio-gel P4 を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによる PS の脱塩結果

deON と同様に、ゲル濾過クロマトグラフィーによる脱塩に

成功したことが確認された。また、PSのピーク（Rt Vol. 63 mL付近）とは別に、糖に由来するピーク（Rt Vol. 102 mL付近）が確認された。これは、1%（v/v）酢酸を用いて反応した際にLPSから切断されたKDO（3-デオキシ-D-マンノ-2-オクツロソン酸）であると考えられる。

以下に、脱塩精製した各種脱アシル化LPSの収量を示した（Table 2-1）。

Table 2-1 各種脱アシル化LPSの収量一覧

出発物		生成物	
大腸菌 C 株 LPS	100 mg	大腸菌 C 株 deP LPS	80.1 mg
大腸菌 C 株 LPS	100 mg	大腸菌 C 株 deON	38.0 mg
大腸菌 C 株 deP LPS	100 mg	大腸菌 C 株 deP deON	35.2 mg
大腸菌 C 株 LPS	100 mg	大腸菌 C 株 PS	36.8 mg
大腸菌 K12 株 LPS	100 mg	大腸菌 K12 株 deON	31.9 mg

deP LPSの調製において、フッ化水素酸による処理後、中和することなく透析を行う方法に変更したことから、調製時間が大幅に短縮され、収率が向上した。本研究では、約80%の収率でdeP LPSを得ることができた。

LPSは、脱アシル化することで、分子量が大きく低下する。たとえば、大腸菌 C 株 LPS および deON の分子量は、4001 および 2703 である。よって、100 mg の LPS から定量的に deON 体が得られた場合の収量は、67.6 mg である。こ

のことから、deON は 50～60 %の収率で得られた計算になる。deON を調製する場合は、反応後の中和により多量に塩ができるため、Bio-gel P4 での精製前に、簡易的に脱塩することを目的として PD-10 カラムによるゲル濾過クロマトグラフィーを行った。ここでの操作による deON の損失が、収率の減少の原因と考えられた。本研究において、1 回のゲル濾過操作で 2.5 mL のサンプルをカラムに載せているが、これは PD-10 カラムの最大サンプル体積である。最大量載せているため、毎回多少のロスが生じ、その操作を繰り返すことが、収率の低下に影響を与えている可能性が考えられた。そのため、1 回の操作でのサンプル量を最大量ではなく、2.0 mL などにして実験を行うことにより、収率の向上が期待できるのではないかと考えられる。

一方、PS では deON に比べ高収率で得られたことが分かった。100 mg の LPS から定量的に PS が得られた場合の収量は、44.6 mg である。つまり、約 83 %の収率で PS が得られたことになる。これは、弱酸分解が KDO のケトシド結合の分解に選択的で望まない他の部分の分解が起こりにくいこと、操作中に PD-10 カラムによる簡易的な脱塩操作がないためであると考えられた。

### 第三章 ヒスチジンタグ融合 F タンパク質 (HisF) の遺伝子工学的調製と精製

HisF (N 末端ヒスチジンタグ融合カプシド F タンパク質)<sup>29)</sup> は、Ni-NTA レジンへの吸着能力が低く、Ni 樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーでの精製がうまくいかなかった。そこで、HisF タンパク質遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて、形質転換を行う宿主菌株を JM109 株から M15 株に変え、HisF の発現と精製を行うことにした。

#### 第一節 pQE-Fu による大腸菌の形質転換とタンパク質発現

目的の HisF 遺伝子を組み込んだプラスミド pQE-Fu を得るため、HisF を発現する JM109 株をアンピシリン添加 LB 液体培地に植菌し、一夜振盪培養した。培養液からアルカリプレップ法によりプラスミドを抽出し、SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) のキットを用いて精製した。得られたプラスミドを用いて M15 株を形質転換し、形質転換を行った大腸菌をアンピシリンおよびカナマイシン添加 LB 寒天培地に塗布した。翌日、得られたコロニーから 4 個を選択し、アンピシリンおよびカナマイシン添加 LB 液体培地に植菌し、IPTG を添加して HisF タンパク質の発現を確認した。

## 第二節 Ni-NTA カラムによる HisF の精製

Ni-NTA (Ni-nitrilotriacetic acid) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる HisF の精製を行った。

HisF を発現する M15 株をアンピシリンおよびカナマイシン添加 LB 液体培地で培養した。培養後、遠心分離により集菌し、破碎緩衝液に懸濁して -30 °C で保存した。

菌体懸濁液を氷上で融解した後、超音波により破碎し、遠心分離により得た上清を可溶性画分とした。また、沈殿に 8 M の尿素を含む変性剤を加えた後、超音波処理により可溶化した画分を不溶性画分とした。

まず、可溶性画分の精製を行った。遠心分離後、上清に 2 mL の Ni-NTA を加え、氷中で 1 時間振盪吸着した。HisF が吸着した樹脂をカラムに充填し、破碎緩衝液およびイミダゾールを含む破碎緩衝液で目的タンパク質を溶出した。その後、12.5 % SDS-PAGE により、溶出タンパク質の確認を行った。

つぎに、不溶性画分の精製を行った。8 M の尿素で変性させた HisF と 2 mL の Ni-NTA を混合し、1 時間振盪吸着した。樹脂をカラムに充填し、尿素の濃度を段階的に下げて巻き戻した後、破碎緩衝液およびイミダゾールを含む破碎緩衝液で目的タンパク質を溶出した。その後、12.5 % SDS-PAGE により、溶出タンパク質の確認を行った。

### 第三節 DEAE セルロファインカラムによる HisF の精製

前節のアフィニティークロマトグラフィーによる方法では、HisF の純度を高めることができなかつたため、イオン交換クロマトグラフィーによる精製を試みた。

菌体懸濁液を氷上で融解した後、超音波により破碎し、遠心分離により可溶性画分を分離した。可溶性画分を透析膜 (MWCO 8,000) に入れ、10 mM NaPB (pH 7.4) に対して一晩透析した。翌日、DEAE セルロファインを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、塩化ナトリウムを含む 10 mM NaPB (pH 7.4) で溶出した。その後、12.5 % SDS-PAGE により、溶出タンパク質の確認を行った。

遠心分離により得られた沈殿に 8 M の尿素を加え、超音波処理を行って可溶化することで、不溶性タンパク質を変性して溶かした溶液を得た。得られた溶液を透析膜 (MWCO 8,000) に入れ、8 ~ 0 M まで段階的に外液の尿素濃度を下げ、タンパク質の巻き戻しを行った。その後、10 mM NaPB (pH 7.4) に対し透析を行い、緩衝液の交換を行った後、DEAE セルロファインを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。塩化ナトリウムを含む 10 mM NaPB (pH 7.4) で溶出した後、12.5 % SDS-PAGE により、溶出タンパク質の確認を行った。



#### **第四節 エタノール沈殿法による HisF の精製**

第二節および第三節での方法では、HisF の純度を高めることが困難であったため、エタノール沈殿法による濃縮を試みた。HisF 溶液に対し、0.25～2.5 倍量のエタノールを加え転倒混和した後、遠心分離によりタンパク質の沈殿を得た。上清を除去し、沈殿を 2×サンプルバッファーに溶解した後、12.5 % SDS-PAGE により、それぞれのバンドを確認した。

#### **第五節 透析による HisF の精製**

クロマトグラフィーを用いた精製、およびエタノール沈殿法によって単一の HisF を得ることが困難であったため、不溶性画分を高濃度で可溶化し、透析による精製を試みた。超音波処理により得られた沈殿を 8 M の尿素により可溶化した溶液を、段階的に尿素の濃度を下げた溶液に対して長時間透析して巻き戻した後、10 mM NaPB (pH 7.4) に対し透析し、12.5 % SDS-PAGE により沈殿と上清のバンドを確認した。

## 第六節 結果および考察

### 第一項 pQE-Fu による大腸菌の形質転換とタンパク質発現

HisF を発現する JM109 株の一夜培養液からプラスミドを抽出し、アガロースゲル電気泳動を行ってプラスミドを確認した (Figure 3-1)。

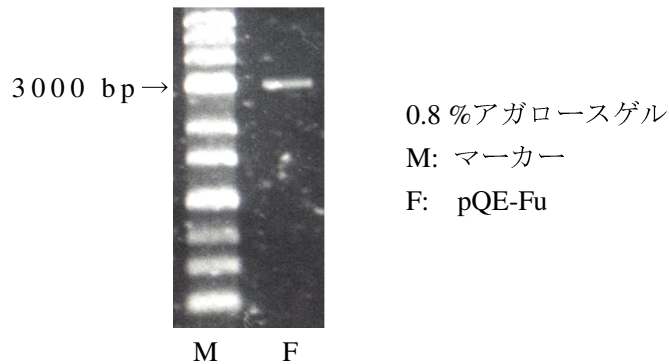


Figure 3-1 HisF のプラスミド DNA

約 3000 bp の位置にプラスミドが認められた。これは、約 1,350 bp の F 断片が 3,400 bp の pQE-30 に組み込まれ、環状プラスミドとして存在しているものであり、HisF をコードしていると考えられた。このプラスミドを用いて、M15 株を形質転換し、得られたコロニーから 4 個を選択し、発現チェックを行った (Figure 3-2)。

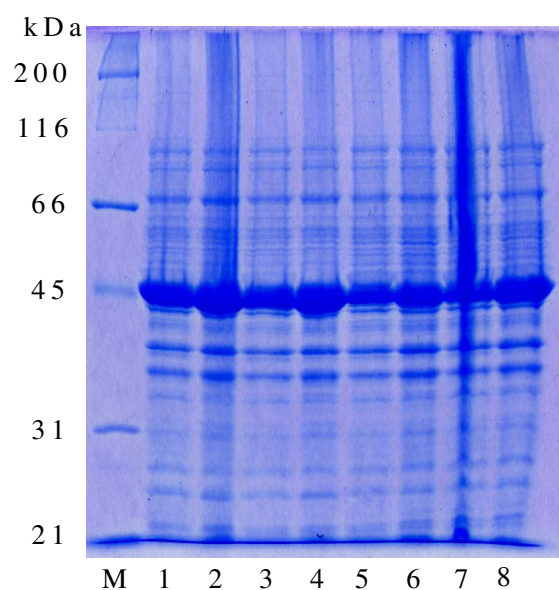


Figure 3-2 pQE-Fu で形質転換した大腸菌 M15 株による  
HisF タンパク質の発現検討の結果

#### 12.5 % SDS-PAGE

M: タンパク質マーカー

- |                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| 1: コロニー1 の IPTG 添加 1 時間後サンプル | 5: コロニー3 の IPTG 添加 1 時間後サンプル |
| 2: コロニー1 の IPTG 添加 3 時間後サンプル | 6: コロニー3 の IPTG 添加 3 時間後サンプル |
| 3: コロニー2 の IPTG 添加 1 時間後サンプル | 7: コロニー4 の IPTG 添加 1 時間後サンプル |
| 4: コロニー2 の IPTG 添加 3 時間後サンプル | 8: コロニー4 の IPTG 添加 3 時間後サンプル |

すべてのコロニーにおいて、HisF の発現が確認されたため、一夜培養液に 10 % のグリセロールを加え、保存菌体を作成し、これ以降の HisF 発現菌体として使用した。

### 第二項 Ni-NTA カラムによる HisF の精製

以前の研究結果により、HisF タンパク質は、Ni-NTA 担体への吸着が弱いことが報告されていたため<sup>29)</sup>、低いイミダゾール濃度で、慎重に溶出する実験を試みた。HisF 可溶性

画分を Ni-NTA により精製した結果を以下に示した (Figure 3-3)。

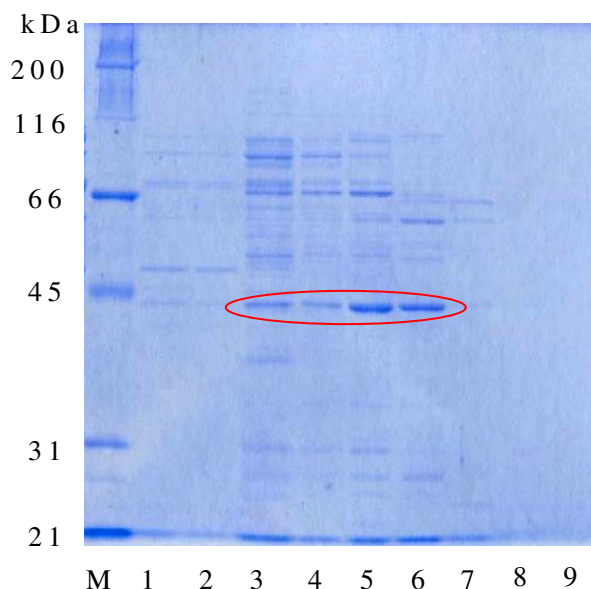


Figure 3-3 HisF 可溶性画分の Ni-NTA による精製結果

#### 12.5 % SDS-PAGE

M : タンパク質マーカー

1 : 0 mM イミダゾールによる溶出画分 1

2 : 0 mM イミダゾールによる溶出画分 2

3 : 10 mM イミダゾールによる溶出画分 1

4 : 10 mM イミダゾールによる溶出画分 2

5 : 20 mM イミダゾールによる溶出画分

6 : 50 mM イミダゾールによる溶出画分

7 : 100 mM イミダゾールによる溶出画分

8 : 150 mM イミダゾールによる溶出画分

9 : 200 mM イミダゾールによる溶出画分

45 kDa よりやや低い位置に主なバンドが確認できた。しかし、不純物が多く単一の HisF として精製することができなかった。また、以前に精製した HisF に比べ、バンドの位置が低分子側にあることから、HisF が切れて断片化してしまった可能性が考えられた。

つぎに、HisF 不溶性画分を Ni-NTA により精製した。その結果、12.5 % SDS-PAGE では、バンドを確認することができなかった。これは、変性させた HisF を巻き戻す作業中

に、Ni レジンとの吸着が弱いため、カラムから流れ出てしまったのではないかと考えられた。そのため、不溶性画分を扱う際には、カラム以外での巻き戻し方法の検討が必要であると考えられた。

### **第三項 DEAE セルロファインカラムによる HisF の精製**

Ni-NTA を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる精製が困難であったため、菌体破砕液を透析することで塩を除去した後、DEAE セルロファインを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製する方法を試みた。

その結果を以下に示した (Figure 3-4)。

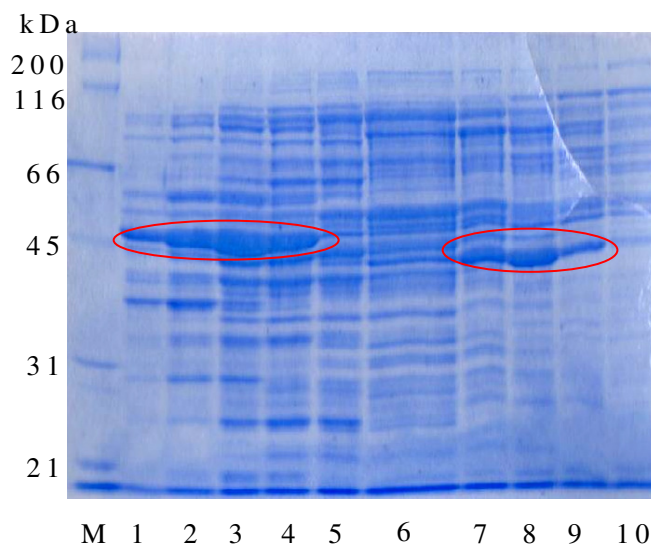


Figure 3-4 HisF 可溶性画分の DEAE セルロファインによる  
精製結果

12.5 % SDS-PAGE

M : タンパク質マーカー

1 : 25 mM 塩化ナトリウム溶出画分

2 : 50 mM 塩化ナトリウム溶出画分

3 : 75 mM 塩化ナトリウム溶出画分

4 : 100 mM 塩化ナトリウム溶出画分

5 : 125 mM 塩化ナトリウム溶出画分

6 : 150 mM 塩化ナトリウム溶出画分

7 : 175 mM 塩化ナトリウム溶出画分

8 : 200 mM 塩化ナトリウム溶出画分

9 : 225 mM 塩化ナトリウム溶出画分

10 : 250 mM 塩化ナトリウム溶出画分

DEAE セルロファインを用いて可溶性画分を精製した結果、Fr. 1~4 および Fr. 7~9 に 2 つのメインバンドが確認された。しかし、得られたタンパク質の量が多かったものの、Ni レジンを用いた方法よりも不純物が多かった。これらの画分に対し、吸着の弱いアフィニティークロマトグラフィーでの精製を行うことは困難であると考えたため、第四項に述べるエタノール沈殿による精製を行うことにした。

つぎに、HisF 不溶性画分を DEAE セルロファインにより精製した結果を示した (Figure 3-5)。

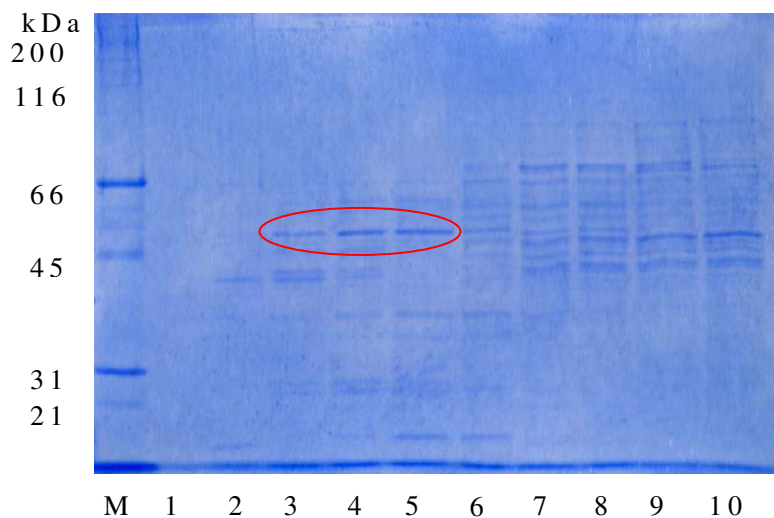


Figure 3-5 HisF不溶性画分のDEAEセルロファインによる  
精製結果

12.5 % SDS-PAGE

M : タンパク質マーカー

1 : 25 mM 塩化ナトリウム溶出画分

2 : 50 mM 塩化ナトリウム溶出画分

3 : 75 mM 塩化ナトリウム溶出画分

4 : 100 mM 塩化ナトリウム溶出画分

5 : 125 mM 塩化ナトリウム溶出画分

6 : 150 mM 塩化ナトリウム溶出画分

7 : 175 mM 塩化ナトリウム溶出画分

8 : 200 mM 塩化ナトリウム溶出画分

9 : 225 mM 塩化ナトリウム溶出画分

10 : 250 mM 塩化ナトリウム溶出画分

前述のように、Ni-NTA カラムにタンパク質を維持させたまま  
まで HisF の巻き戻しを行うことはうまくいかなかったため、  
タンパク質の変性抽出画分を透析膜に入れ、段階的に外液  
の尿素の濃度を下げる方法によって、巻き戻しを行った。  
その後、DEAEセルロファインを用いて不溶性画分を精製し  
た結果、Fr. 3~5 に HisF とと思われるバンドが確認された。  
単一の HisF を精製することはできなかったが、可溶性画分  
に比べ不純物をかなり少なくすることができた。

#### 第四項 エタノール沈殿法による HisF の精製

前項で得られた HisF 可溶性画分を DEAE セルロフアインにより精製した画分に対し、エタノール沈殿を行った。それぞれの画分には十分に塩が含まれた状態であるため、エタノールのみを添加した。その際のエタノールの濃度は、各サンプルに対し 0.25～2.5 倍量に調整した。エタノール沈殿法により沈殿したサンプルを 10 mM NaPB (pH 7.4) に溶解し、12.5 % SDS-PAGE により確認した結果を以下に示した (Figure 3-6)。

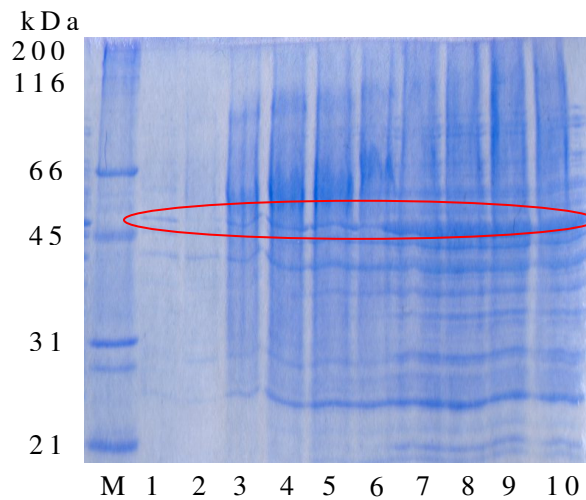


Figure 3-6 HisF のエタノール沈殿による濃縮結果

##### 12.5 % SDS-PAGE

M : タンパク質マーカー

1 : 0.25 倍量添加エタノール沈殿

2 : 0.5 倍量添加エタノール沈殿

3 : 0.75 倍量添加エタノール沈殿

4 : 1 倍量添加エタノール沈殿

5 : 1.25 倍量添加エタノール沈殿

6 : 1.5 倍量添加エタノール沈殿

7 : 1.75 倍量添加エタノール沈殿

8 : 2 倍量添加エタノール沈殿

9 : 2.25 倍量添加エタノール沈殿

10 : 2.5 倍量添加エタノール沈殿



エタノール沈殿の結果、HisFのバンドは確認されたものの、単一なバンドは得られなかった。また、0.75倍量以上のエタノールを加えた場合は、多くのタンパク質が沈殿し、精製できないことが分かった。単一なHisFの精製には至らなかったが、0.25倍量のエタノールを加えた場合では、夾雑物を大幅に減らすことができた。

### 第五項 透析による HisF の精製

8 M 尿素により可溶化したタンパク質の変性抽出画分を透析膜に入れ、8~0 M まで段階的に尿素の濃度を変化させ、タンパク質の巻き戻しを行った。その際、高濃度、長時間の条件で巻き戻しを行った結果、沈殿が生成した。沈殿と上清に含まれるタンパク質を 12.5 % SDS-PAGE により確認した (Figure 3-7)。

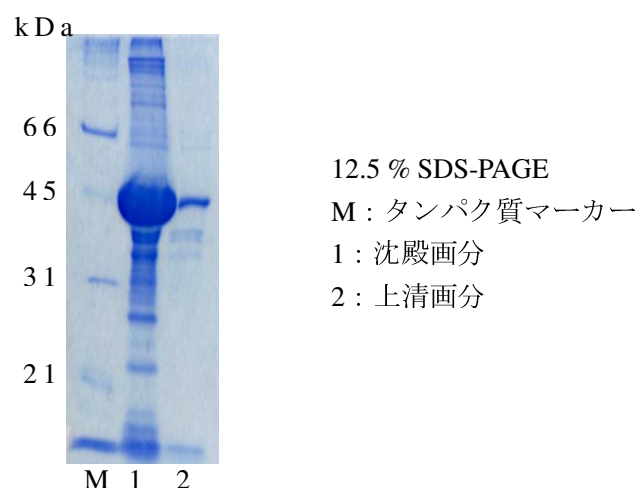


Figure 3-7 透析による HisF 精製の結果

その結果、上清、沈殿ともに HisF が含まれていることがわかった。そして、夾雑物の多くは HisF とともに沈殿することが確認され、収量は少ないものの、上清画分からこれまでで最も高純度の HisF を得ることができた。

## 第四章 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた脱アシル化 LPS の分離および分子種の同定

これまで、当研究室では LPS を混合物として扱い、フェージタンパク質との相互作用解析の研究を行ってきた。しかし、前述のように、LPS には非定量的置換基の数が異なる多数の分子種が含まれており<sup>45)</sup>、これらの置換基がフェージタンパク質との相互作用に影響を及ぼすことが示されてきた<sup>46-48)</sup>。そこで、HPLC を用いて、LPS に含まれる置換基数の異なる分子種の実験的分離を試みた。そして、それらの分子種とフェージタンパク質との相互作用を解析することにより、置換基が与える影響をより詳細に解析することを目指した。

### 第一節 陰性電荷に基づく分離モードによる脱アシル化 LPS の分析方法の検討

脱アシル化 LPS に含まれるリン酸や KDO のカルボキシル基に由来する負電荷を手掛かりとして分離することを目的とし、陰イオン交換クロマトグラフィーを検討することにした。

イオン交換クロマトグラフィーは、荷電残基の結合した担体に対し、それと対をなす荷電を持つ目的物を静電的に吸着させ、それらの静電的結合を妨げる電解質（一般には

NaClなどの塩)を流すことにより、結合の弱い物質から順に溶出させる方法である。各種カラムを検討した結果、4級アミンを持つ HiTrapQ (1 mL、GE Healthcare 社)が、吸着と溶出の挙動に優れることがわかった。また、溶離液は、10 mM NaPB (pH 7.4) と 250 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM NaPB (pH 7.4) を混合して、塩化ナトリウムの濃度勾配を作って使用した。

糖鎖は 190~195 nm 付近でしか紫外吸収を示さないため、直接紫外検出を行う場合、移動相が水だけの条件で、かつ、純粋な試料でないと検出は困難である。そのため、本研究ではポストカラム蛍光誘導体化法<sup>49)</sup>を採用した。

ポストカラム蛍光誘導体化法とは、カラムによりサンプルを分離した後、反応試薬を添加して蛍光発色団を持つ化合物に変換し、検出する方法である。この蛍光発色団を持つ化合物の構造は、解明されていない。本研究では、カラムにより分離した後、反応溶液と混合し、100℃に加熱することで蛍光検出する方法を用いた。誘導体化のための試薬として 6 mM 過ヨウ素酸ナトリウムと 100 mM タウリンを含む反応溶液 (pH 7.0) を用いた。

また、理論段数の向上を目指し、カラムを 2 本または 5 本連結した実験も行った。

HiTrapQ と同様に、陰イオン交換カラムである Partisil (Partisil 5 SAX RAC II、ジーエルサイエンス社)を用いて、分析を行った。Partisil が、HiTrapQ と異なる点は、担体が

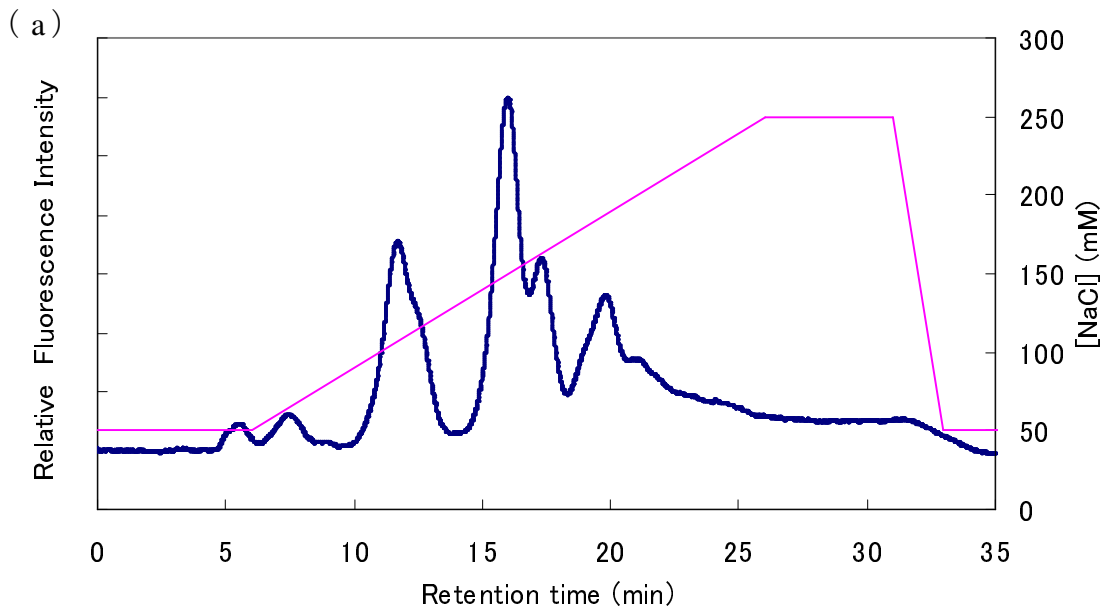
シリカゲルである点である。そのため、セファロースを担体とした HiTrapQ とは異なる分離が得られると考えた。溶離液および誘導体化試薬は、HiTrapQ を用いた分析と共通の条件で実験を行った。

さらに、イオン交換クロマトグラフィーと同様に、荷電に基づく分離方法である、逆相イオンペアクロマトグラフィーを行った。逆相イオンペアクロマトグラフィーとは、移動相中に疎水性のイオンペア試薬を加えてサンプルとイオンペアを形成させ、荷電を覆うとともにサンプルに疎水性を持たせて、逆相モードで分離する方法である。イオンペア試薬には、比較的大きな疎水基を有する有機イオン種が用いられ、陰イオン性試料にはアルキルアンモニウムが、陽イオン性試料にはアルキルスルホン酸がよく使われている。サンプルがイオンペアを形成すると、荷電数に依存して疎水性が大きくなり、逆相モードで分離することが可能となる。この方法は、イオン交換クロマトグラフィーに比べ、種類が豊富、比較的安価、高性能な逆相カラムが使用できるという点で優れている。カラムは、再現性に優れている Symmetry (Waters 社) を採用した。溶離液は、15 mM リン酸と 5 mM トリブチルアミンを含む溶液 (pH 7.0) とアセトニトリルを用い、誘導体化の条件と試薬は他と共通で実験を行った。

#### 第四節 結果および考察

##### 第一項 HiTrapQ カラムを用いる強塩基性陰イオン交換クロマトグラフィーによる大腸菌 C 株 PS、deON、deP deON の分析結果

本研究では、 $\phi$ X174 の宿主となる大腸菌 C 株の LPS における非定量的置換基に着目し、大腸菌 C 株の脱アシル化 LPS (PS、deON、deP deON) の分析を行った。4 級アミンを持つ強塩基性陰イオン交換カラムである HiTrapQ を用いたところ、脱アシル化 LPS に含まれる分子種の分離に成功した (Figure 4-1)。



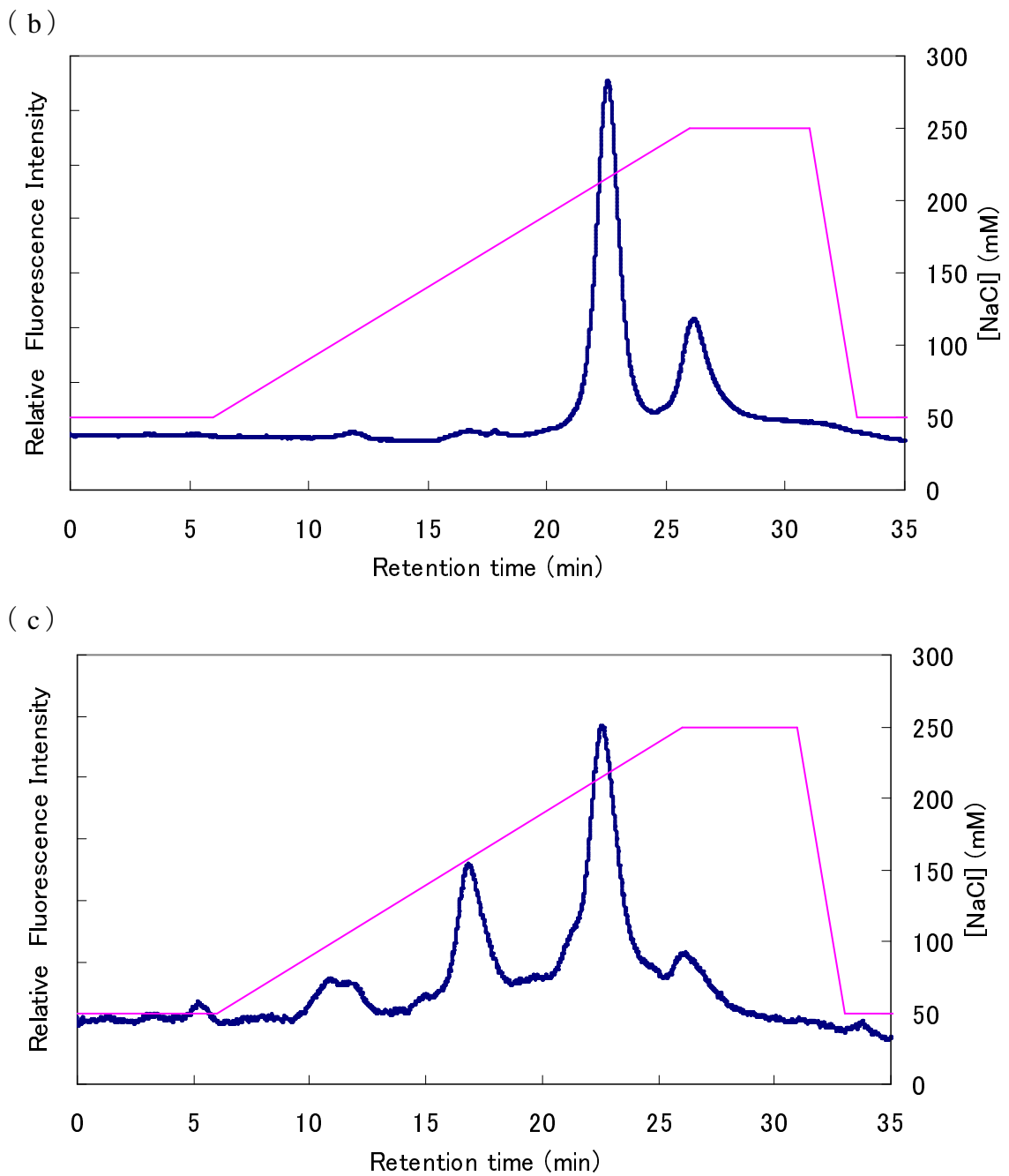


Figure 4-1 HiTrapQ を用いた脱アシル化 LPS のクロマトグラム

(a) PS      (b) deON      (c) deP deON

移動相: 10 mM NaPB (pH 7.4) / 10 mM NaPB (pH 7.4) + 250 mM NaCl  
 流速: 1.0 mL/min    サンプル注入量 : 20  $\mu$ L (1.0 mg/mL)

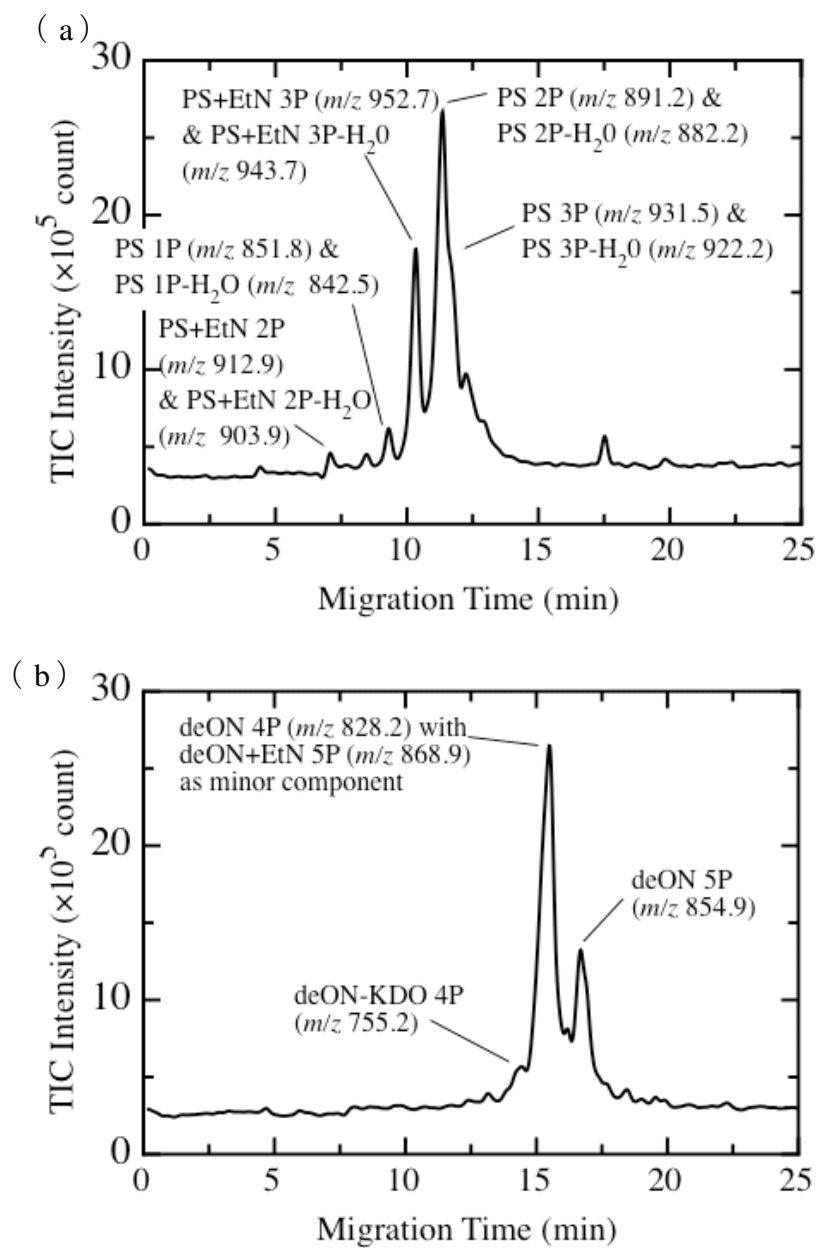


Figure 4-2 CZE/ESI-IT-MS による PS および deON の  
 エレクトロフェログラム

(a) CZE/ESI-IT-MS による PS の分析結果

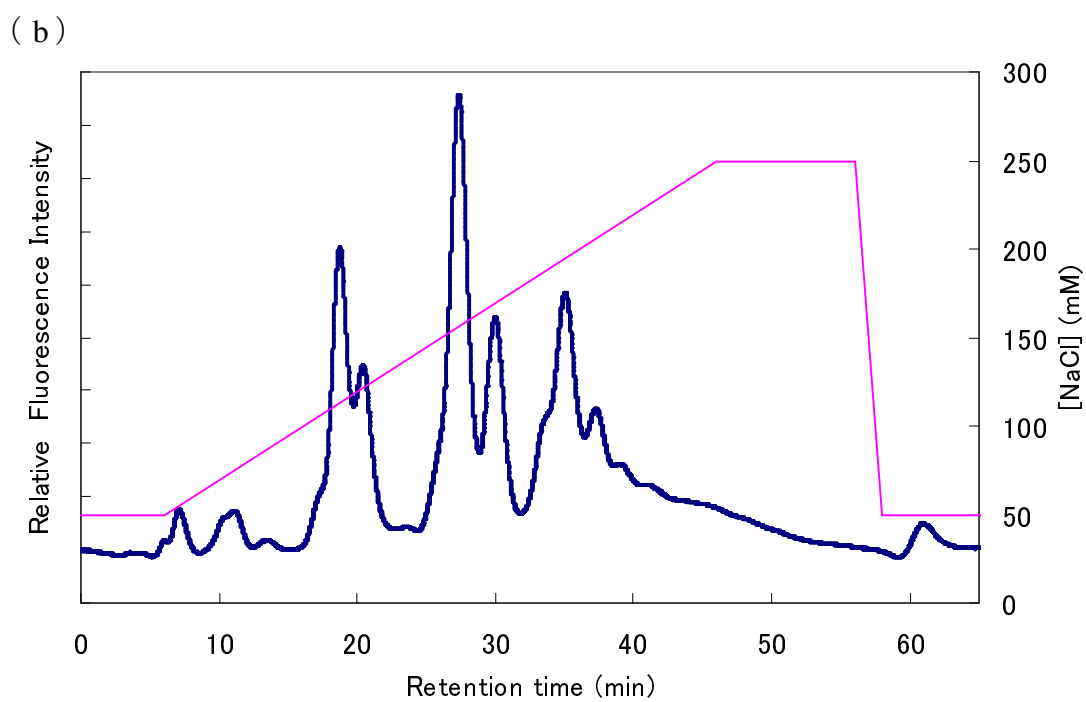
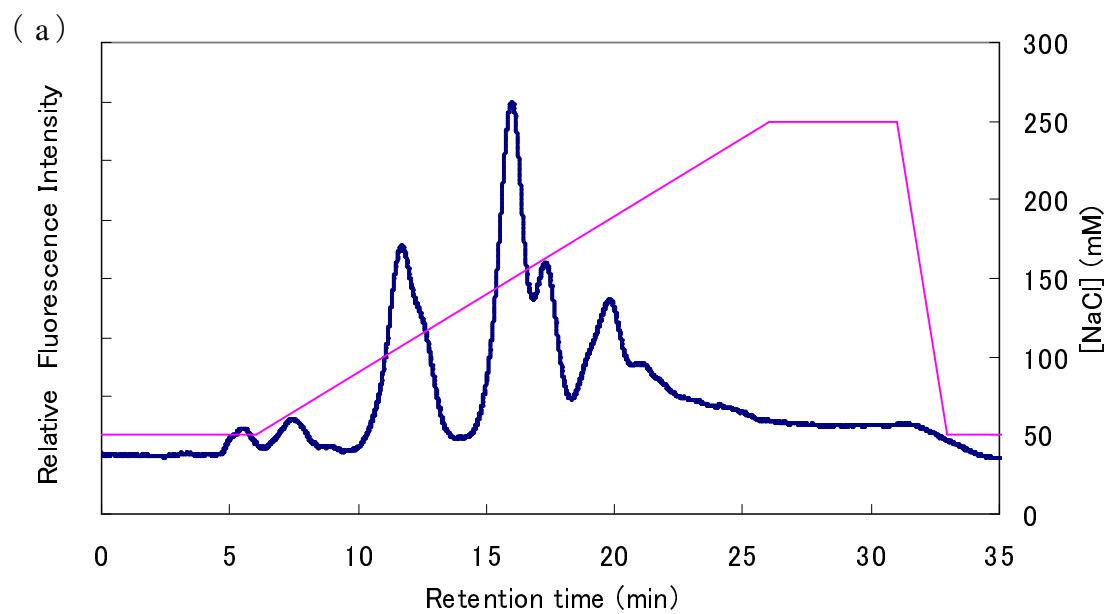
(b) CZE/ESI-IT-MS による deON の分析結果



HiTrapQ を用いて PS を分析した結果、4 つの大きなピークが確認された (Figure 4-1)。Figure 4-2 に同じサンプルをキャピラリー電気泳動/質量分析を共同研究者が行ったデータを示した。両者の比較の結果、保持時間の短い分子種から、PS 1P (7.7 分)、PS 3P EtN (11.9 分)、PS 2P (16.1 分)、PS 3P (20.0 分) であると分かった (Figure 4-2)。したがって、PS の主成分は PS 2P であることが確認できた。同様に、deON では 2 つの大きなピークが確認され、deON 4P (22.6 分)、deON 5P (26.3 分) が含まれていることが確認され、主成分は deON 4P であった。deP deON では 5 つのピークが確認され、deON との比較から、deON 4P (22.6 分)、deON 5P (26.3 分) が含まれていることが分かり、deP deON においても deON 4P が主成分であることが分かった。フッ化水素酸処理によってリン酸残基が切断されたため、deON 5P の含量は低くなっており、よりリン酸残基の少ない分子種が優勢になっていることが確認できた。そして、deP deON のクロマトグラム Figure 4-1 (c) 上の 5.4 分、11.1 分、17.0 分のピークは、それぞれ deON 1P、deON 2P、deON 3P と推測された。

HiTrapQ1 本 (1 mL) を用いた分離では、ピーク幅が広く、理論段数が高いとはいえない結果が得られた。そこで、HiTrapQ を連結することにより、理論段数の向上を試みた。その結果、連結しない場合と比較し、理論段数が向上した (Figure 4-3)。カラムを連結して分析を行うことにより、

溶出しないおそれや分析時間の延長が懸念されたが、それほど延長せず、理論段数の向上が達成できた。



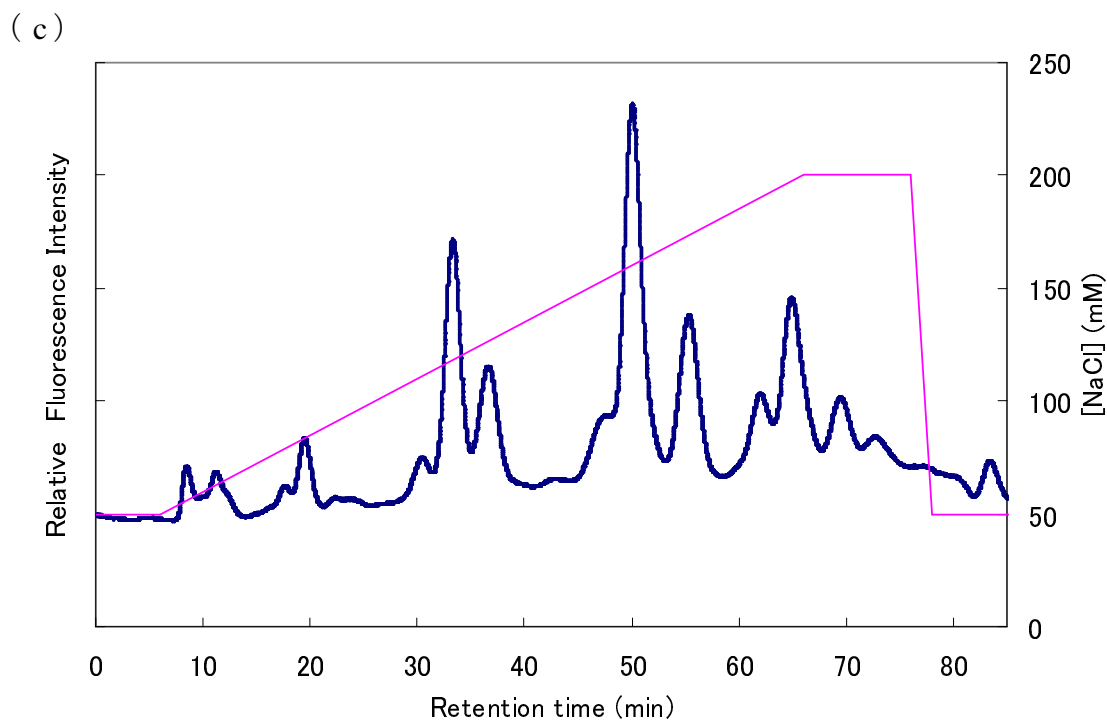


Figure 4-3 連結した HiTrapQ による PS のクロマトグラム

(a) HiTrapQ 1 本 (1 mL)      (b) HiTrapQ 2 本 (2 mL)

(c) HiTrapQ 5 本 (5 mL)

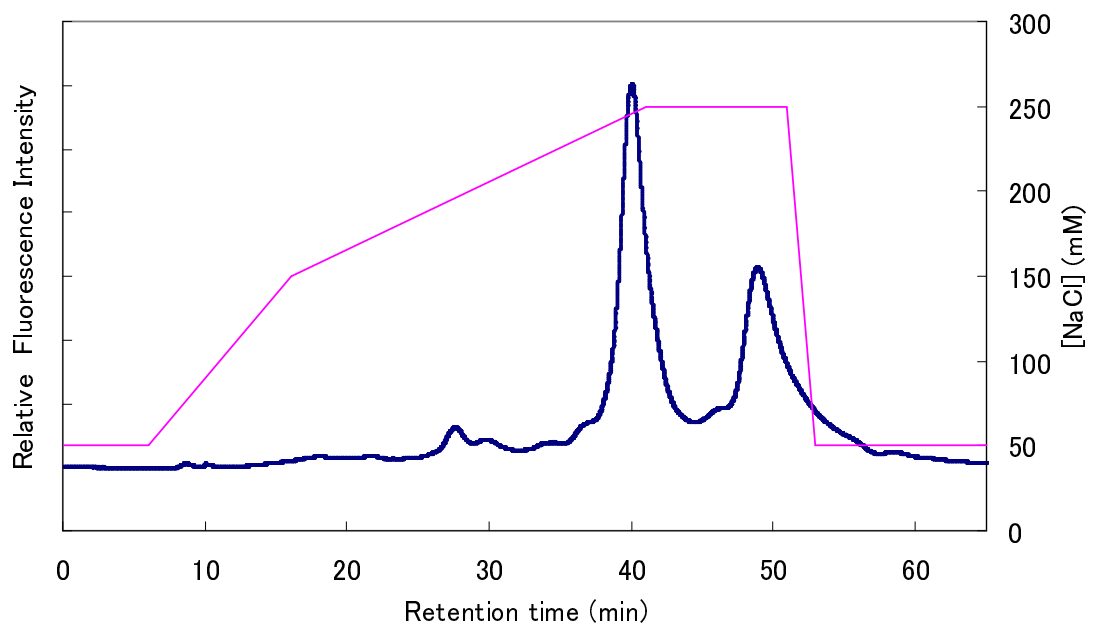
移動相: 10 mM NaPB (pH 7.4) / 10 mM NaPB (pH 7.4) + 250 mM NaCl

流速: 1.0 mL/min    サンプル注入量: 20  $\mu$ L (1.0 mg/mL)

## 第二項 Partisil カラムを用いる強塩基性陰イオン交換クロマトグラフィーによる大腸菌 C 株 PS、deON、deP deON の分析結果

つぎに、シリカゲルを担体とし、4 級アミンを持つ陰イオン交換カラムである Partisil を選択した。HiTrapQ を用いた分析結果と比較したところ、deON ではピーク数が著しく増加した (Figure 4-4)。

( a )



( b )

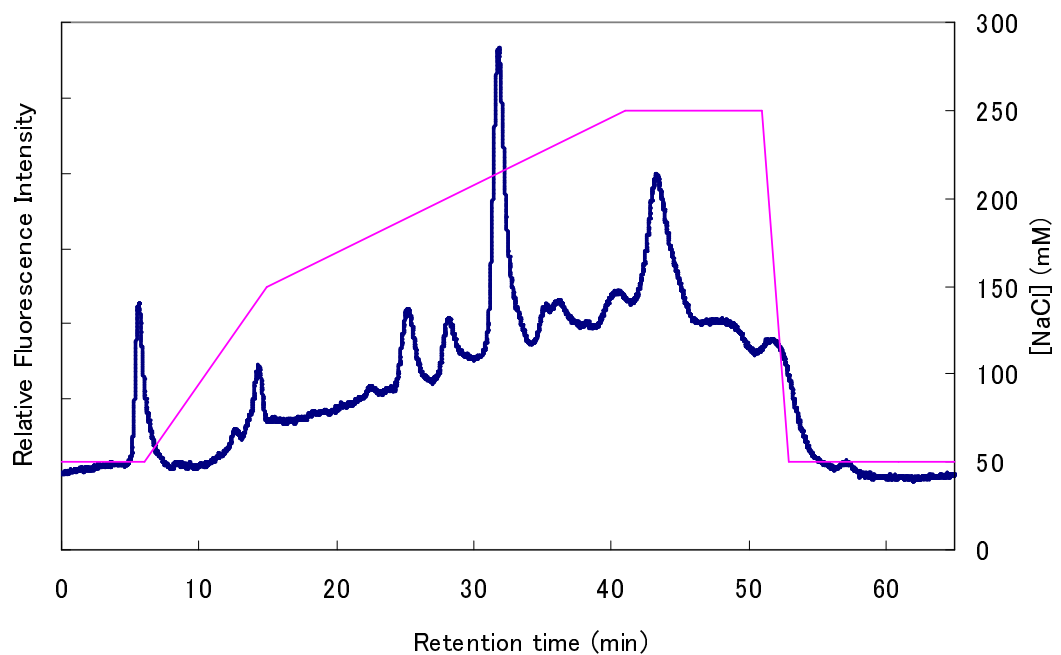


Figure 4-4 deON のクロマトグラムの比較

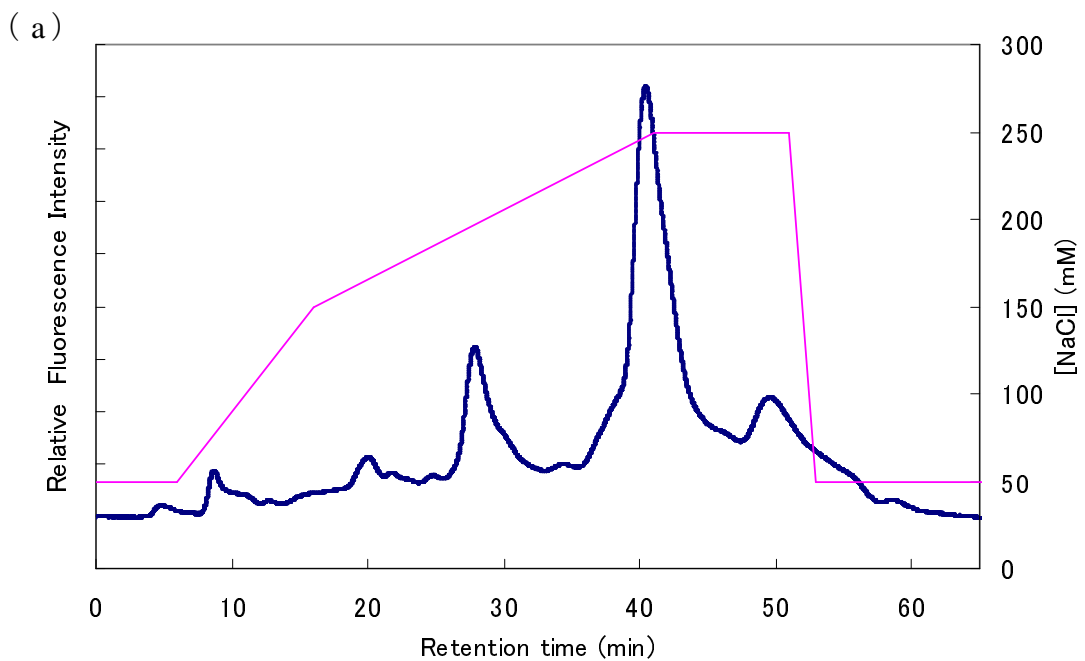
( a ) HiTrapQ 5 本 ( 5 mL )

( b ) Partisil 5 SAX RAC II

移動相: 10 mM NaPB (pH 7.4) / 10 mM NaPB (pH 7.4) + 250 mM NaCl

流速: 1.0 mL/min サンプル注入量: 20  $\mu$ L (1.0 mg/mL)

deP deON の場合も、HiTrapQ での分析に比べ Partisil では、検出されるピーク数が増加した (Figure 4-5)。HiTrapQ では、静電的な相互作用が主な分解能を持っており、リン酸残基の違いでまとまって溶出する挙動が認められたが、Partisil では、シリカゲル担体による糖鎖の構造とリン酸残基の数により複雑に分離したと考えられた。



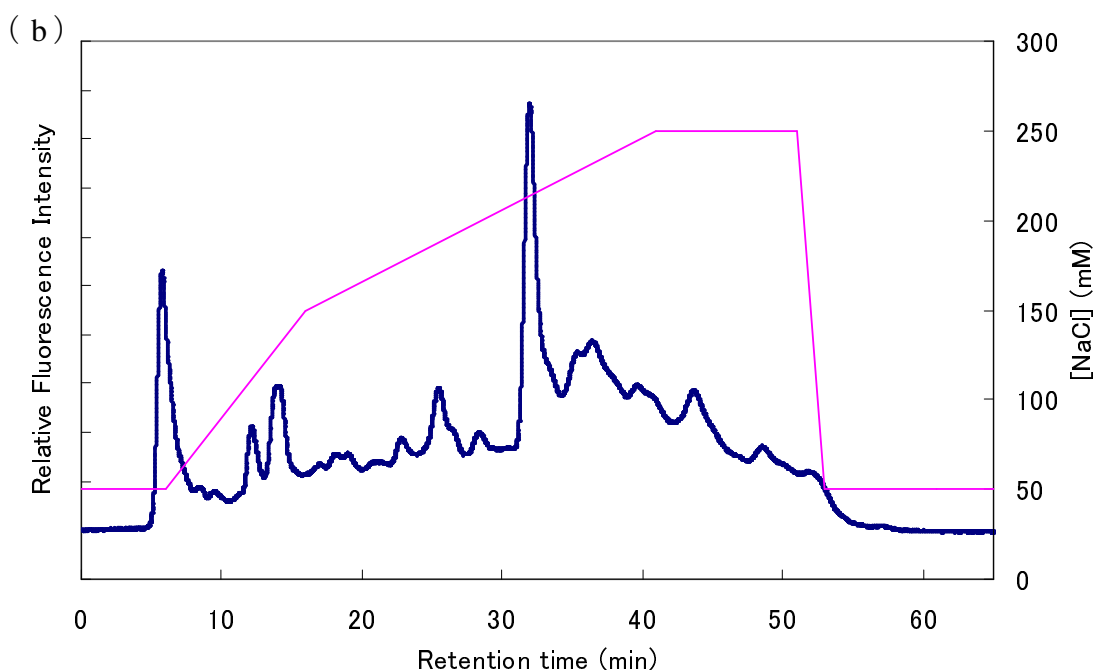


Figure 4-5 deP deON のクロマトグラムの比較

(a) HiTrapQ 5本 (5 mL) (b) Partisil 5 SAX RAC II

移動相: 10 mM NaPB (pH 7.4) / 10 mM NaPB (pH 7.4) + 250 mM NaCl  
 流速: 1.0 mL/min サンプル注入量: 20  $\mu$ L (1.0 mg/mL)

Figure 4-4 および Figure 4-5 より、HiTrapQ での分析において 40.6 分および 49.8 分に検出された 4P、5P の主なピークは、Partisil での分析において、32.0 分および 44.0 分に検出される大きなピークであると推定された。また、その周辺に溶出するピークは、同じ数のリン酸残基を持っていても、その置換位置が異なる分子種であると考えられ、それらを分離することに成功したと考えられる。さらに、これらの結果から、HiTrapQ に比べ Partisil では、低濃度の塩化ナトリウムで溶出するということが分かった。

一方、PS では deON や deP deON とは対照的に、ピーク数はそれほど増減しなかった (Figure 4-6)。

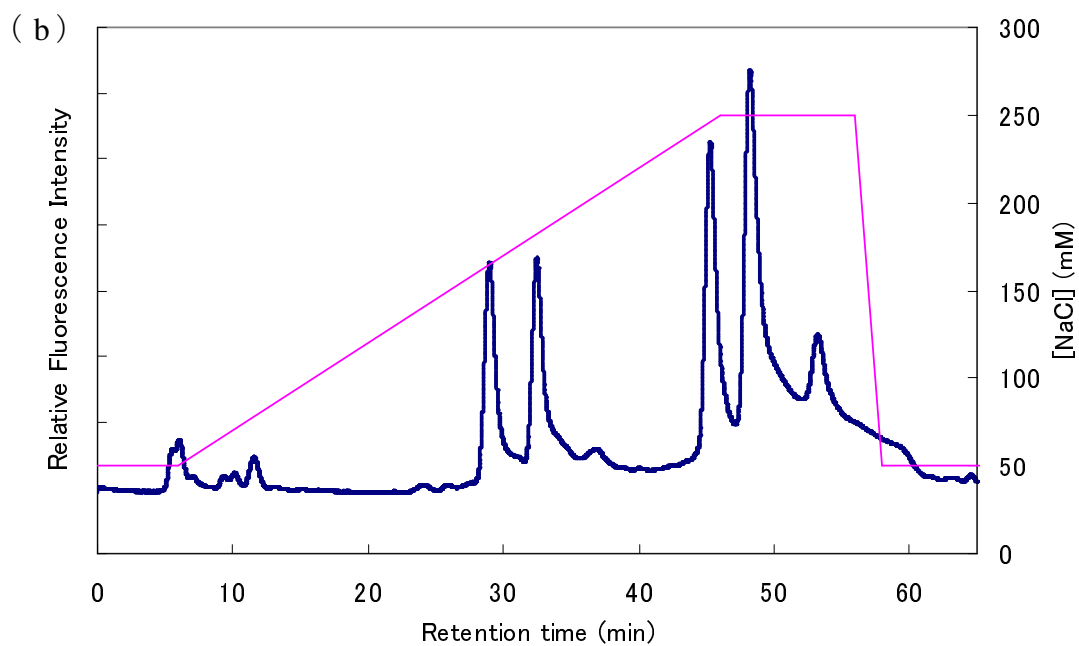
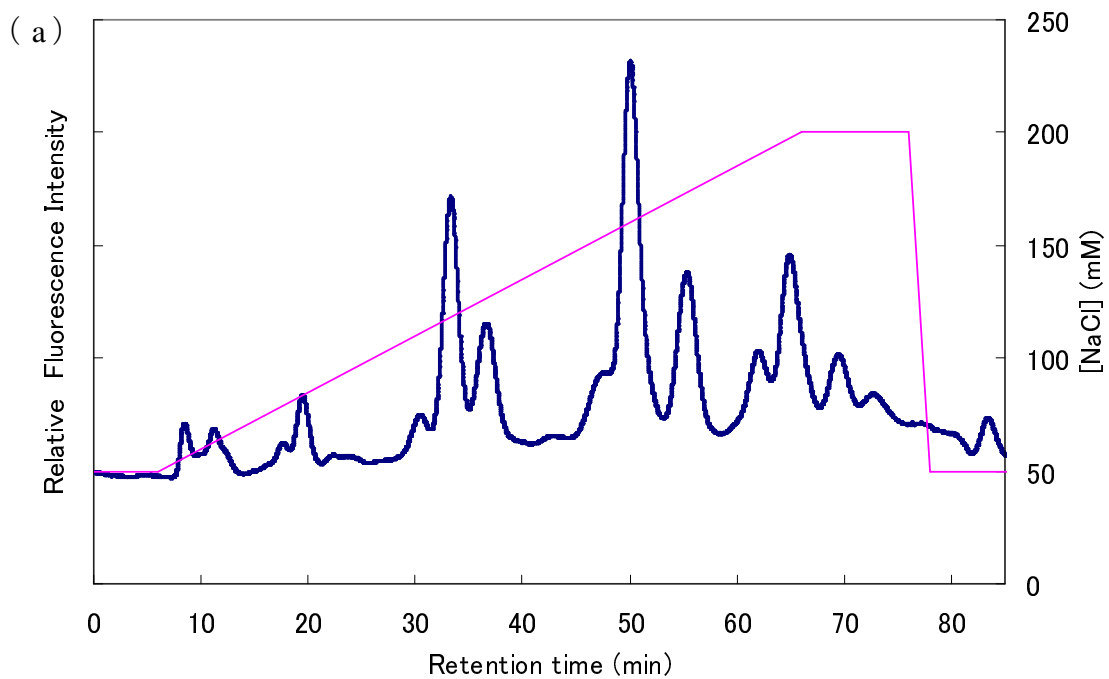


Figure 4-6 PS のクロマトグラムの比較

(a) HiTrapQ 5本 (5 mL) (b) Partisil 5 SAX RAC II

移動相: 10 mM NaPB (pH 7.4) / 10 mM NaPB (pH 7.4) + 250 mM NaCl

流速: 1.0 mL/min サンプル注入量: 20  $\mu$ L (1.0 mg/mL)

糖鎖長が長い脱アシル化 LPS において、ピークの増加が顕著であったことから、Partisil カラムのシリカゲル担体と糖鎖構造との間で、相互作用による分離が起きているのではないかと考えられた。

### **第三項 Symmetry カラムを用いる逆相イオンペアクロマトグラフィーによる大腸菌 C 株 PS、deON、deP deON の分析結果**

さらに、電荷に基づく分離法である、イオンペアクロマトグラフィーによる分析を行った。イオンペア試薬の検討を行い、トリブチルアミンを採用した。カラムには再現性に優れている Symmetry (Waters 社) を用いた。しかし、これまでに用いたカラムによる分離で得られたクロマトグラムとは大きく異なり、ピークと化学種の対応を推定することが困難であった (Figure 4-7)。



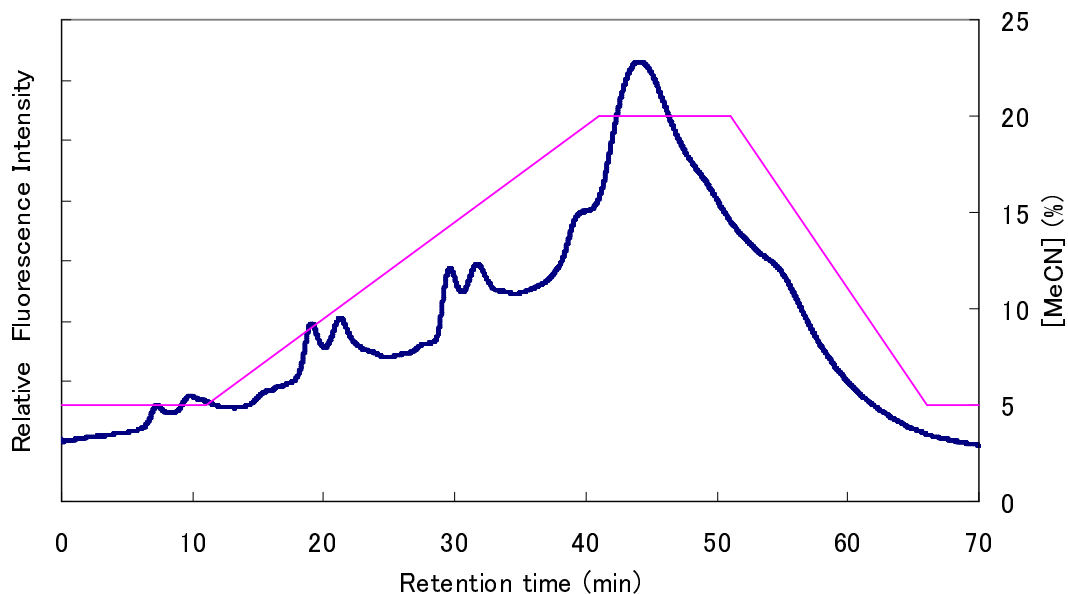


Figure 4-7 逆相イオンペアクロマトグラフィーによる  
PS のクロマトグラム

移動相: 15 mM リン酸+5 mM トリブチルアミン (pH 7.0) /アセトニトリル  
流速: 1.0 mL/min サンプル注入量 : 20  $\mu$ L (1.0 mg/mL)

また、35分以降に幅の広い大きなピークが確認された。このピークは、サンプルを注入しない場合にも現れるため、サンプル由来のピークではないことが確認できた。しかし、これまでの分析法と同様に、1.0 mg/mLに調整したサンプルではピークが小さく、正確に測定するためにはより高濃度での分析が必要だと考えられた。そこで、PSを1.0~8.0 mg/mLになるように調整し、分析を行った (Figure 4-8)。同時に、各ピークに対し、濃度依存的にピーク強度が強くなることを確認した (Figure 4-9)。

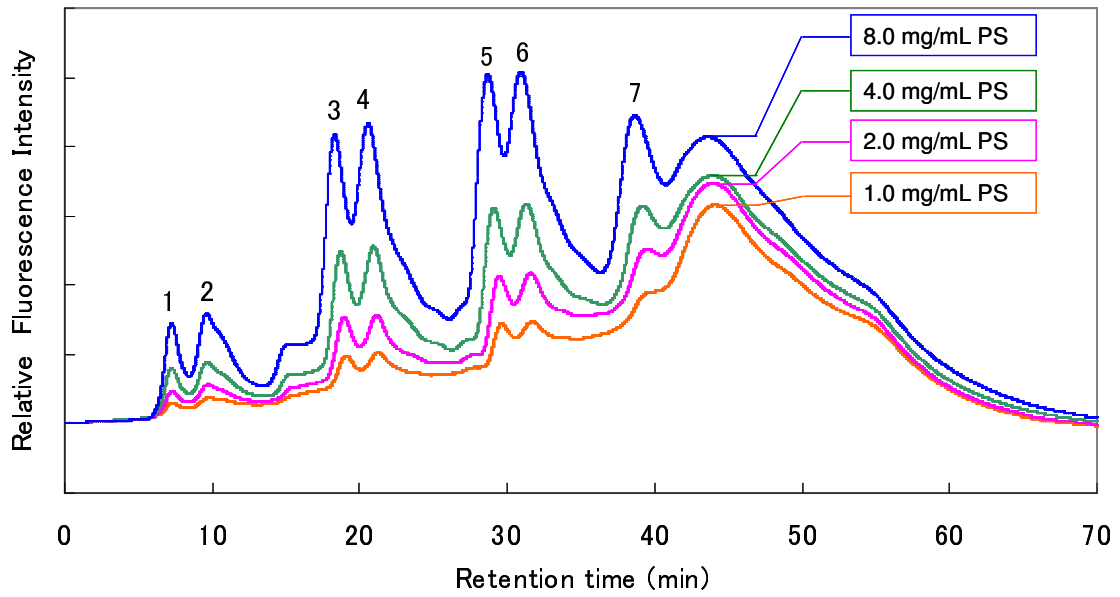


Figure 4-8 逆相イオンペアクロマトグラフィーを用いた PS のクロマトグラムの変化

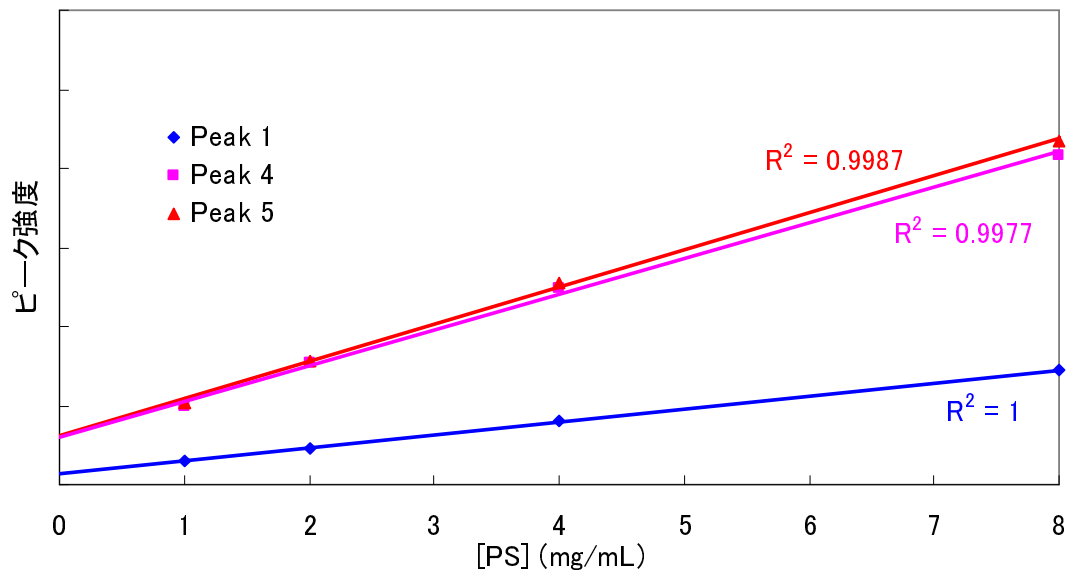


Figure 4-9 逆相イオンペアクロマトグラフィーを用いた PS 分析におけるピーク強度の濃度依存性

Peak1 (7.7 分)、4 (21.6 分)、5 (29.9 分) について、ピーク強度の変化図を示した。分析の結果、濃度依存的にピーク強度が強くなることが確認され、また、その他のピークについても同様の結果を得た。このことから、トリブチルアミンの添加によって蛍光糖鎖発色の感度が下がると考えられた。トリブチルアミン水溶液を調整する際に、空気中の不純物質が混入している可能性が考えられるため、トリブチルアミン水溶液をカラムに流し、不純物質が担体に吸着して取り除かれたと考えられる溶液を用いて、サンプルを注入せずに測定した。その結果、35 分以降のピークはわずかに減少したものの、蛍光糖鎖発色の感度を保つことはできなかった。製造元が異なる試薬を用いることで、蛍光感度が変わることも考えられるため、蛍光糖鎖発色に影響を及ぼさないイオンペア試薬を調製すること、また、溶液中の不純物質を取り除く方法の検討が、今後の課題である。

#### **第四項 その他脱アシル化 LPS の分析結果**

前項の結果より、分離能が高く分子種の同定が可能であったことから、5 本連結 HiTrapQ を用いて、他の脱アシル化 LPS の分析を行った。分析を行った脱アシル化 LPS は、冨田によって大腸菌 C 株 deP deON から単離された HF-1 $\alpha$ 、HF-2、および第二節において調製した大腸菌 K12 株 deON である。HF-1 $\alpha$  および HF-2 は、冨田によって構造が決定さ

れており、HF-1 $\alpha$ はひとつのリン酸残基を持ち、HF-2 はリン酸を持たない構造であることが分かっている (Figure 4-10)。

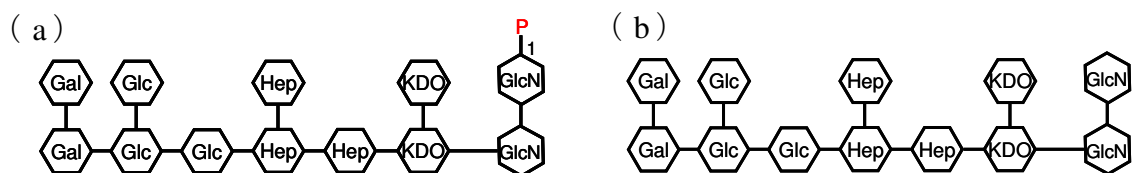
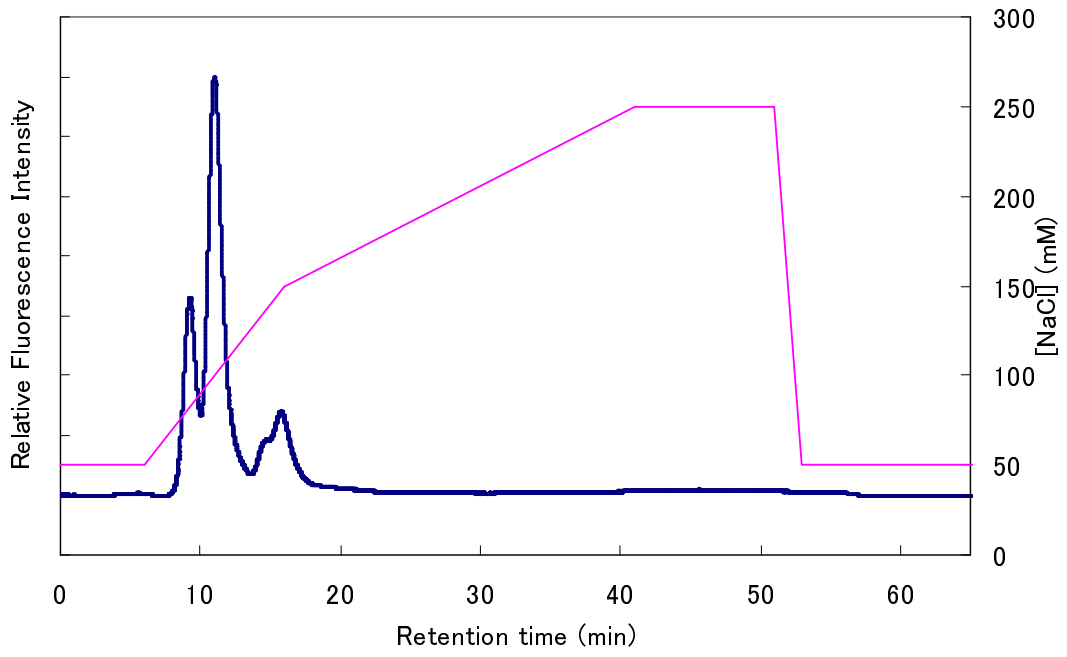


Figure 4-10 HF-1 $\alpha$ および HF-2 の構造式

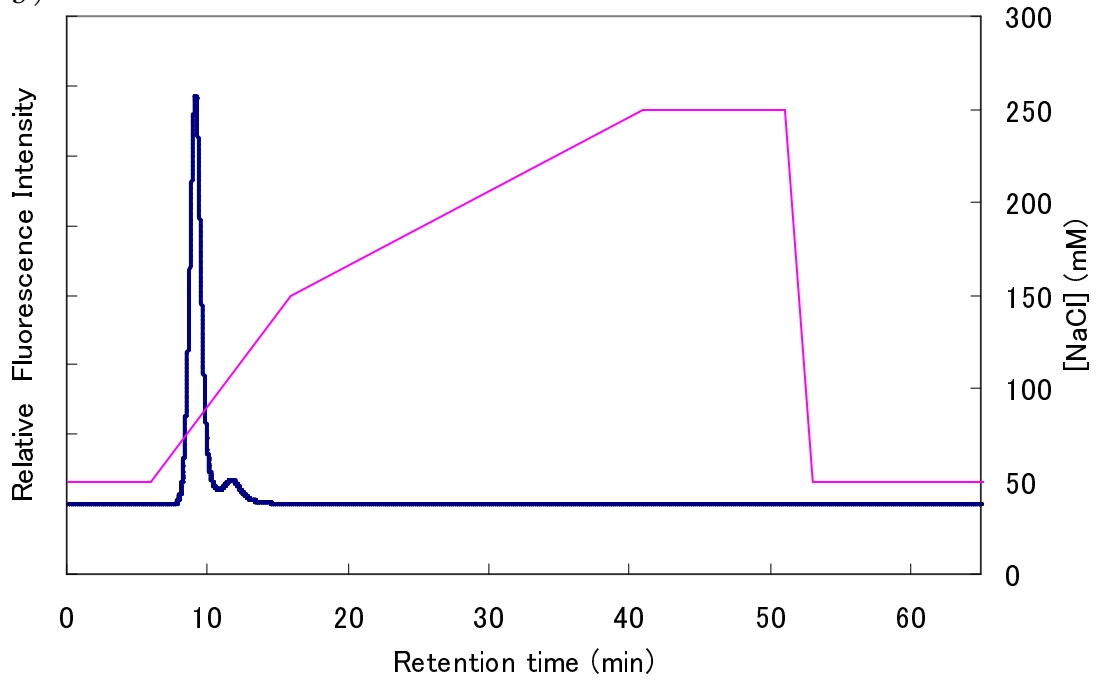
(a) HF-1 $\alpha$  (b) HF-2

また、大腸菌 K12 株を選択した理由は、Ra 型の LPS を発現しているにもかかわらず、 $\phi$ X174 の宿主とならない株であるからである。大腸菌 K12 W3110 株は、大腸菌 C 株と同様に Ra 株であるにも関わらず、宿主にならない。そして、その理由としては、非還元末端に Hep を持っていることしか考えられない。そこで、ファージタンパク質と糖鎖との相互作用において、大腸菌 C 株と何らかの違いがあると考え、まず HPLC による分離を試みた。以下に、3 種の脱アシル化 LPS の分析結果を示した (Figure 4-11)。

( a )



( b )



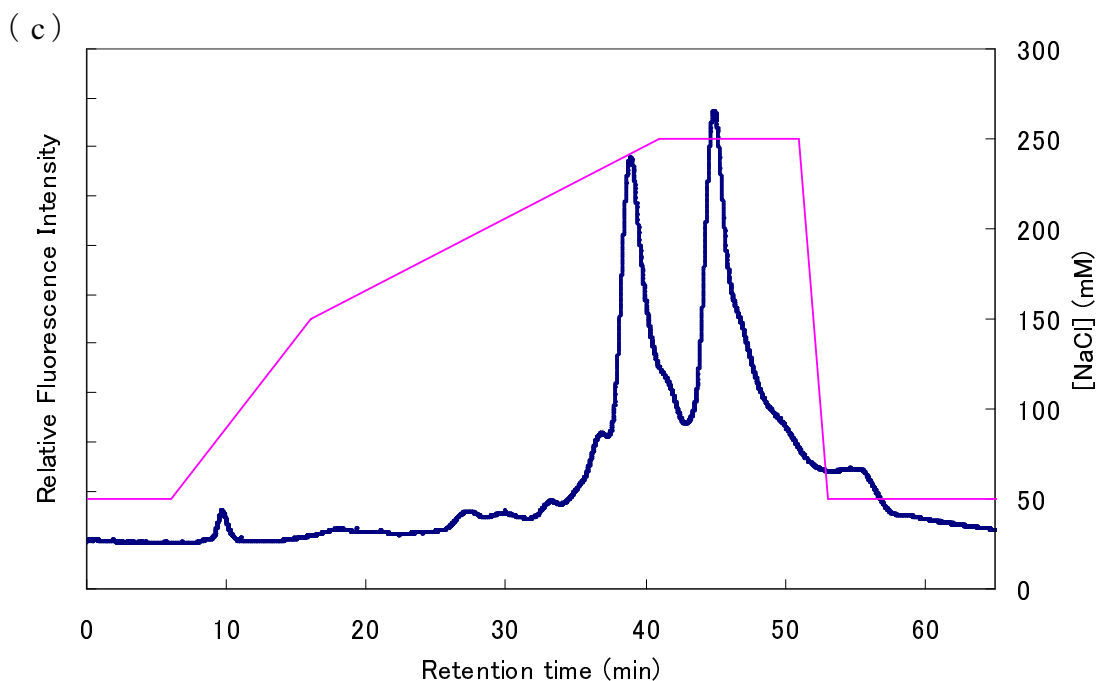


Figure 4-11 5本連結 HiTrapQ によるクロマトグラム

(a) 大腸菌 C 株 HF-1 $\alpha$       (b) 大腸菌 C 株 HF-2

(c) 大腸菌 K12 株 deON

移動相: 10 mM NaPB (pH 7.4) / 10 mM NaPB (pH 7.4) + 250 mM NaCl

流速: 1.0 mL/min    サンプル注入量: 20  $\mu$ L (1.0 mg/mL)

HF-1 $\alpha$ および HF-2 は、主成分以外の分子種の混入も確認されたが、HF-1 $\alpha$ の主成分であるリン酸を 1 個持つ分子種は 11.0分、HF-2 の主成分であるリン酸を持たない分子種は 9.2分のピークであると同定された。また、HF-1 $\alpha$ に含まれる 9.2 分に出現するピークが、HF-2 であることもわかった。つぎに、大腸菌 K12 株 deON では、2つの大きなピークが確認された。これは、大腸菌 C 株 deON の 4P、5P の保持時間とよく一致しており、糖鎖の違いにより多少の保持時間の相違があるものの、大腸菌 K12 株の主成分も、同様に 4P、

5P ではないかと予想された。実際に、質量分析の結果、大腸菌 K12 株の主成分が 4P、5P であることが確認され、大腸菌 K12 株 deON 4P (39.1 分)、5P (45.0 分) と同定された。

## 第五章 HPLC を用いた脱アシル化 LPS とファージタンパク質との相互作用解析

HPLC を用いて脱アシル化 LPS に含まれる分子種の分離に成功したことを受け、相互作用解析への応用を試みた。この方法は、各脱アシル化 LPS とタンパク質を混合し、結合しなかった脱アシル化 LPS 画分を HPLC により観測することにより、ファージタンパク質（cHisG；C 末端ヒスチジントグ融合 G タンパク質、HisH；N 末端ヒスチジントグ融合 H タンパク質）と結合する分子種の結合選択性を調べるといものである。これにより、各分子種との相互作用をそれぞれ解析することが可能となり、非定量的置換基が相互作用に与える影響の解明に繋がると考えた。

### 第一節 遠心限外濾過を用いた脱アシル化 LPS とファージタンパク質との相互作用解析

限外濾過膜を有するマイクロ遠心チューブ（Amicon 社、MWCO 10,000）に、10 mM NaPB（pH 7.4）で希釈したファージタンパク質を 100  $\mu$ L ずつ加えた。つぎに、1 mg/mL になるように 10 mM NaPB（pH 7.4）で調整した脱アシル化 LPS を、マイクロチューブへ 100  $\mu$ L ずつ加え、よく混合した。室温で 10 分間相互作用させた後、遠心限外濾過し、限外濾過膜を通過した低分子画分を HPLC により分析した。使用



したファージタンパク質は、限外濾過膜の透過分子量限界よりも十分に大きく、限外濾過膜を通過できない。そのため、高分子画分には、ファージタンパク質と脱アシル化 LPS の複合体および相互作用しなかったファージタンパク質が含まれ、低分子画分である濾液には、相互作用しなかった遊離の脱アシル化 LPS のみが含まれることになる。この濾液を HPLC 分析に供し、ピーク強度変化と加えたタンパク質濃度を用いて線形フィッティングを行い、親和性の指標となる 50 % 結合濃度を算出した。

## **第二節 結果および考察**

### **第一項 線形フィッティングによる相互作用解析**

相互作用解析には、HiTrapQ (1 mL) (1 本、2 本連結、5 本連結) によるデータを用いた。相互作用解析に用いたファージタンパク質は、cHisG、HisH および HisF で、cHisG および HisH は、当研究室で確立された精製法に基づき精製したものを使用した。HisF は、第三章第五節に述べた方法により精製したものを使用した。脱アシル化 LPS にファージタンパク質を加え、相互作用させた後、遠心限外濾過により結合に使用されなかった脱アシル化 LPS のみを分離し、HPLC 分析に供した。その後、ピーク強度の減少率と加えたタンパク質濃度から線形フィッティングを行い、50 % 結合

濃度を算出することで親和性を比較した。以下に、そうした解析の一例を示した (Figure 5-1)。

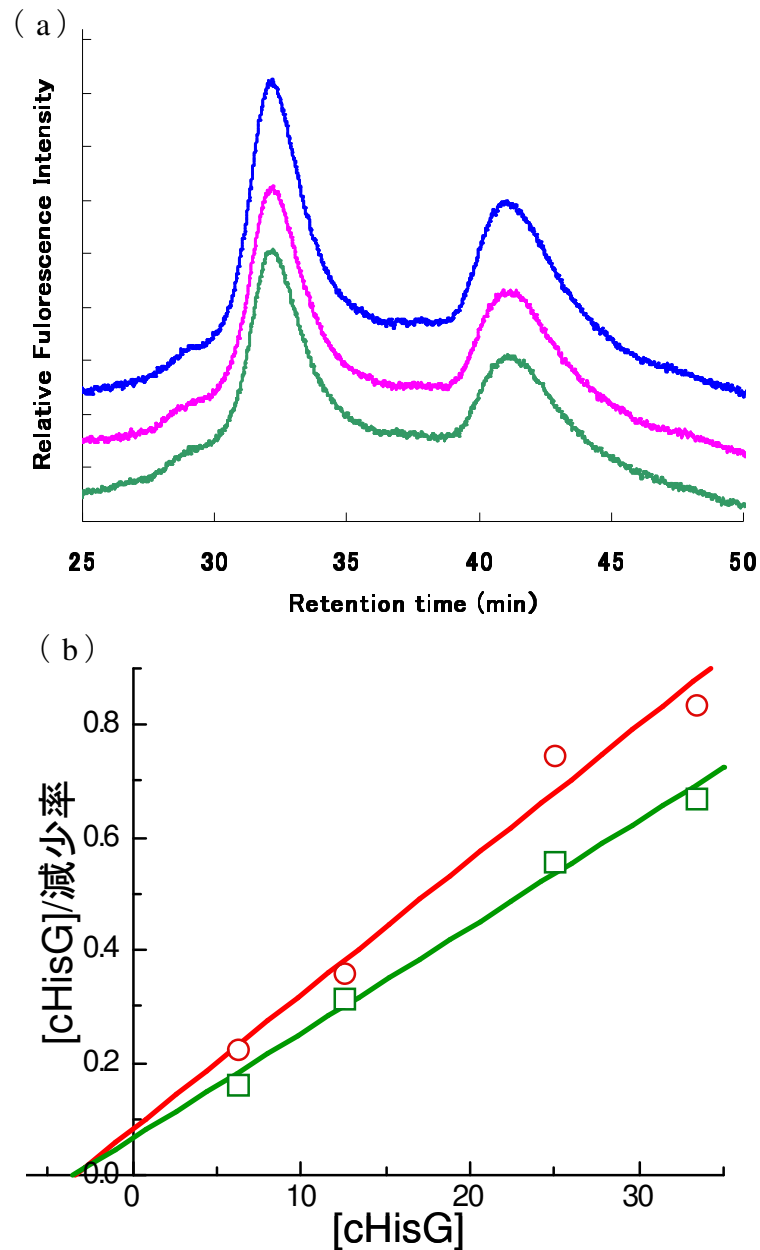


Figure 5-1 2本連結 HiTrapQ による相互作用解析の結果

(a) deON と cHisG の相互作用を分析したクロマトグラム

Rt=32分が deON 4P、Rt=41分が deON 5P

(b) deON と cHisG の線形フィッティング結果

deON 4P が ○、deON 5P が □

deON 4P (32.3 分) と deON 5P (41.2 分) のピーク強度 (高さ) をクロマトグラム解析ソフトで測定した。タンパク質を加えていない時のピーク強度を基準として、タンパク質を加えた際のピーク強度の減少率を相対値として算出し、[cHisG]/減少率を [cHisG] に対してプロットした。線形最小二乗法で直線のフィッティングを行い、その x 切片から 50 % 結合濃度を算出した。この線形を採用した理由は、今回の実験のように、加えいくべき LPS 脱アシル化誘導体を一定量に保ち、タンパク質濃度を変化させる実験方法では、このフィッティングを用いることが 50 % 結合濃度の算出に適していると考えたためである。

Figure 5-1 (a) に示したように、加えたタンパク質の濃度に依存して、ピーク強度が減少した。つまり、タンパク質濃度依存的に相互作用が強くなり、濾液に含まれる遊離の脱アシル化 LPS が減少したことが分かった。ここで、遠心によって分離している最中に解離が起こることが心配されたが、相互作用は強く、解離は極めて遅いことがわかった。

## 第二項 大腸菌 C 株 deON および PS における相互作用解析

HiTrapQ を 1 本 (1 mL)、2 本連結 (2 mL)、5 本連結 (5 mL) の 3 種の条件で分析し、大腸菌 C 株 deON および PS について、相互作用を解析した結果を示した。これにより、クロ

マトグラムの分離能の向上が 50 %結合濃度の算出に及ぼす影響を検討した。

まず、HiTrapQ を用いた結果を示した (Table 5-1、5-2)。

Table 5-1 HiTrapQ による deON と cHisG との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 % 結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 deON 4P	28.5	$3.2 \pm 1.5$
大腸菌 C 株 deON 5P	33.8	$2.8 \pm 4.3$

Table 5-2 HiTrapQ による PS と cHisG との相互作用解析結果

成分	保持時間 (min)	50 % 結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 PS 1P	7.6	$9.8 \pm 5.7$
大腸菌 C 株 PS 3P EtN	11.9	$5.0 \pm 4.1$
大腸菌 C 株 PS 2P	16.0	$2.8 \pm 2.0$
大腸菌 C 株 PS 3P	19.7	$2.7 \pm 1.2$

deON および PS では、リン酸残基数の増加に伴い、cHisG との相互作用が強くなった。また、PS 1P では、他の分子種と比較し、相互作用がとくに弱くなった。しかし、どの分子種においてもフィッティングの誤差が大きいことが課題であった。

そこで、カラムを 2 本連結することにより、分離能が向上したデータを用いて解析した結果を示した (Table 5-3～5-6)。

Table 5-3 2 本連結 HiTrapQ による deON と cHisG との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 %結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 deON 4P	32.3	3.4 $\pm$ 2.9
大腸菌 C 株 deON 5P	41.2	3.5 $\pm$ 1.8

Table 5-4 2 本連結 HiTrapQ による deON と HisH との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 %結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 deON 4P	32.3	4.3 $\pm$ 2.1
大腸菌 C 株 deON 5P	41.2	9.8 $\pm$ 5.8

Table 5-5 2 本連結 HiTrapQ による PS と cHisG との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 %結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 PS 3P EtN I	18.9	2.9 $\pm$ 1.4
大腸菌 C 株 PS 3P EtN II	20.6	4.1 $\pm$ 3.8
大腸菌 C 株 PS 2P I	27.6	3.9 $\pm$ 4.2
大腸菌 C 株 PS 2P II	30.4	5.0 $\pm$ 4.4
大腸菌 C 株 PS 3P I	34.1	—

大腸菌 C 株 PS 3P II	35.6	6.8 ± 1.5
大腸菌 C 株 PS 3P III	38.0	—

Table 5-6 2本連結 HiTrapQ による PS と HisH との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 %結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 PS 3P EtN I	18.9	8.5 ± 5.8
大腸菌 C 株 PS 3P EtN II	20.6	12.1 ± 10.0
大腸菌 C 株 PS 2P I	27.6	6.9 ± 4.5
大腸菌 C 株 PS 2P II	30.4	5.5 ± 3.5
大腸菌 C 株 PS 3P I	34.1	7.0 ± 4.6
大腸菌 C 株 PS 3P II	35.6	8.6 ± 5.2
大腸菌 C 株 PS 3P III	38.0	12.3 ± 8.6

deON、PS のどちらにおいても、HisH に比べ cHisG の 50 % 結合濃度が小さな値となり、それぞれの脱アシル化 LPS との相互作用は、cHisG の方が強いことが分かった。deON の 4P、5P では、相互作用の強度を示す 50 %結合濃度にほぼ差がないことが確認できた。いっぽう、HisH との相互作用においては、5P よりも 4P の方が、相互作用が強いことが分かった。PS と cHisG との相互作用においては、3P EtN、2P、3P における主なピークの 50 %結合濃度は、8.5 ± 5.8、6.9 ± 4.5、8.6 ± 5.2 となり、また、PS と HisH との相互作用においては、2P との相互作用が最も強いことが分かった。これ

らの結果は、1本の HiTrapQ を用いて解析した結果と異なる点があるが、分析精度の向上に伴い、様々なことが分かるようになったことが確認できた。しかし、どちらも 50 % 結合濃度の誤差範囲が大きいことが課題であった。

さらに、ピークの分離能が高い 5 本連結 HiTrapQ により解析した結果を示した (Table 5-7~5-10)。

Table 5-7 5 本連結 HiTrapQ による deON と cHisG との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 % 結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 deON 4P	32.3	$1.5 \pm 0.65$
大腸菌 C 株 deON 5P	41.2	$7.9 \pm 0.66$

Table 5-8 5 本連結 HiTrapQ による deON と HisH との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 % 結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 deON 4P	32.3	$4.8 \pm 3.1$
大腸菌 C 株 deON 5P	41.2	—

Table 5-9 5 本連結 HiTrapQ による PS と cHisG との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 % 結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 PS 2P EtN II	11.5	$1.4 \pm 0.3$

大腸菌 C 株 PS 1P I	17.9	2.3 ± 6.0
大腸菌 C 株 PS 3P EtN I	30.4	1.1 ± 0.7
大腸菌 C 株 PS 3P EtN II	33.0	3.2 ± 1.2
大腸菌 C 株 PS 2P I	47.5	1.1 ± 0.02
大腸菌 C 株 PS 2P II	49.7	4.9 ± 0.4
大腸菌 C 株 PS 2P III	55.0	4.5 ± 4.0
大腸菌 C 株 PS 3P I	61.8	1.2 ± 0.7
大腸菌 C 株 PS 3P II	64.6	6.4 ± 2.7
大腸菌 C 株 PS 3P III	69.2	3.0 ± 2.4
大腸菌 C 株 PS 3P IV	72.7	0.5 ± 0.4

Table 5-10 5本連結 HiTrapQ による PS と HisH との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 %結合濃度 (μM)
大腸菌 C 株 PS 2P EtN I	8.6	2.5 ± 3.2
大腸菌 C 株 PS 2P EtN II	11.5	0.15 ± 0.24
大腸菌 C 株 PS 1P I	17.9	0.11 ± 0.60
大腸菌 C 株 PS 3P EtN I	30.4	0.32 ± 0.34
大腸菌 C 株 PS 3P EtN II	33.0	0.24 ± 0.33
大腸菌 C 株 PS 2P I	47.5	0.23 ± 0.30
大腸菌 C 株 PS 2P II	49.7	0.22 ± 0.31
大腸菌 C 株 PS 2P III	55.0	0.16 ± 0.29
大腸菌 C 株 PS 3P I	61.8	0.19 ± 0.33



大腸菌 C 株 PS 3P II	64.6	0.25 ± 0.34
大腸菌 C 株 PS 3P III	69.2	0.35 ± 0.43

これまでの解析結果に比べ、deON、PS ともに 50 %結合濃度の誤差が明らかに小さくなった。これは、HPLC の分離能の向上に伴い、解析に用いるピーク高さの再現性と精度が向上したためと考えられた。とくに、PS と cHisG との解析結果において、その傾向が顕著であった。

deON と HisH との親和性は、deON と cHisG との親和性よりも低いということが分かった。また、PS と cHisG との相互作用解析においては、同じ分子種であっても、リン酸残基の結合している位置が異なると考えられる分子種では、それぞれの親和性に差があることが確認された。一方、PS と HisH との相互作用解析では、線形フィッティングを行った際、3P EtN、2P、3P の分子種において、ほぼ同様の親和性が認められた。これにより、2 つ以上に負電荷が増えても親和性が強くなると判断されることから、HisH では、PS の糖鎖を強く認識するものの、負電荷残基の数による影響はさほど受けないと考えられた。また、cHisG では、2 つ以上の負電荷を持つ分子種に対する親和性が異なることから、HisH に比べ、負電荷残基が親和性に与える影響が大きいと考えられた。表中に 50 %結合濃度の数値が出ていないものは、ピーク強度が弱く、線形フィッティングにおいて 50 %結合濃度の算出が困難であったものである。

### 第三項 その他脱アシル化 LPS の相互作用解析結果

大腸菌 C 株 deP deON、HF-1 $\alpha$ 、HF-2 および大腸菌 K12 株 deON について、5 本連結 HiTrapQ を用いて相互作用解析した結果を示した。なお、大腸菌 C 株 deP deON については、1P~5P が含まれていると仮定し、Table を作成した (Table 5-11~5-12)。

Table 5-11 各種脱アシル化 LPS と cHisG との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 %結合濃度 ( $\mu$ M)
大腸菌 C 株 deON 1P	8.9	1.1 $\pm$ 0.68
大腸菌 C 株 deON 2P	20.3	0.16 $\pm$ 0.27
大腸菌 C 株 deON 3P	28.0	0.31 $\pm$ 0.39
大腸菌 C 株 deON 4P	40.6	3.5 $\pm$ 3.2
大腸菌 C 株 deON 5P	49.8	3.3 $\pm$ 2.0
大腸菌 C 株 HF-1 $\alpha$	11.0	0.78 $\pm$ 1.9
大腸菌 C 株 HF-2	9.2	3.8 $\pm$ 2.3
大腸菌 K12 株 deON 4P	39.1	1.0 $\pm$ 1.0
大腸菌 K12 株 deON 5P	45.0	0.83 $\pm$ 0.51

Table 5-11 各種脱アシル化 LPS と HisH との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 %結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 deON 1P	8.9	$0.61 \pm 0.57$
大腸菌 C 株 deON 2P	20.3	$0.48 \pm 0.46$
大腸菌 C 株 deON 3P	28.0	$0.30 \pm 0.93$
大腸菌 C 株 deON 4P	40.6	$1.8 \pm 1.6$
大腸菌 C 株 deON 5P	49.8	$0.82 \pm 1.8$
大腸菌 C 株 HF-1 $\alpha$	11.0	$1.4 \pm 0.94$
大腸菌 C 株 HF-2	9.2	$3.3 \pm 2.3$
大腸菌 K12 株 deON 4P	39.1	$1.6 \pm 0.21$
大腸菌 K12 株 deON 5P	45.0	$0.15 \pm 0.13$

Table 5-12 各種脱アシル化 LPS と HisF との相互作用解析結果

分子種	保持時間 (min)	50 %結合濃度 ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 deON 4P	40.6	$0.40 \pm 0.44$
大腸菌 C 株 deON 5P	49.8	$0.28 \pm 0.32$
大腸菌 K12 株 deON 4P	39.1	$0.48 \pm 0.32$
大腸菌 K12 株 deON 5P	45.0	$0.71 \pm 0.50$

大腸菌 C 株 PS に比べ、全体的に誤差が大きくなってしまったが、50 %結合濃度の算出に成功した。

脱リン酸処理を行った大腸菌 C 株 deON では、親和性に

大きな差は見られなかったが、ファージタンパク質との親和性は 2P がもっとも強いと計算された。

HF-1 $\alpha$ および HF-2 では、リン酸残基が 1 個存在する HF-1 $\alpha$  に比べ、リン酸のまったく含まれない HF-2 では相互作用が弱くなることが分かった。また、これら 2 つの LPS 脱リン酸脱アシル誘導体では、cHisG との親和性と HisH との親和性に大きな差はみられなかった。

大腸菌 K12 株 deON では、cHisG および HisH との相互作用解析において 4P に比べ 5P との相互作用が強いという結果が得られ、HisF との相互作用解析では、5P に比べ 4P との相互作用が強いという結果が得られた。大腸菌 K12 株 deON とファージタンパク質との 50% 結合濃度は、大腸菌 C 株 deON とファージタンパク質との 50% 結合濃度と比較し、大きな差が確認されなかった。この結果から、それぞれの分子種とファージタンパク質の親和性の大きさが、感染性と一致しないということがわかった。また、ファージタンパク質は、大腸菌 K12 株 deON とほぼ同様の親和性を示すことから、結合はするものの感染はしない結合の仕方があることが示唆された。つまり、感染初期状態である可逆的吸着が起こる可能性は考えられたが、高次構造の変化を伴う不可逆的吸着であるエクリップス状態にはならず、感染することがないと考えると説明がつくと考えられた。

## 第六章 総括

本研究では、HPLCを用いてバクテリオファージ $\phi$ X174のレセプターとなるLPS脱アシル誘導体を分離すること、およびファージタンパク質との相互作用解析を行うことを目的とした。

脱アシル化LPSとして、大腸菌C株 deON、deP deON、PS、大腸菌K12株 deONの4種を調製した。また、ファージタンパク質であるHisFの調製および精製を試みた。その結果、HisFを発現する組み換えM15株の分離に成功したが、タンパク質を単一に精製することはできておらず、精製法の検討が今後の課題として残った。

LPS中に含まれる非定量的置換基に基づいて分離するため、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相イオンペアクロマトグラフィーを検討した。陰イオン交換カラムとして、セファロースを担体とし4級アミンを持つHiTrapQ、およびシリカゲルを担体とし4級アミンを持つPartisil 5 SAX RAC IIを用いた。また、逆相イオンペアクロマトグラフィーのカラムとして、再現性に優れたODSカラムのSymmetryを選択した。HiTrapQを用いて分析したところ、負電荷残基数の少ない分子種から溶出することに成功し、良好なクロマトグラムを得ることができた。また、HiTrapQカラムを直列に連結することにより分解能が向上し、これまで分離が困難であった多数の分子種を分離することに成

功した。さらに、CZE/MSにより得られたクロマトグラムとの比較から、大腸菌 C 株 deON および PS に含まれる分子種を容易に同定することができた。その結果、deON には 4P、5P が含まれ、PS には 2P EtN、1P、3P EtN、2P、3P が含まれていることが確認された。

一方、Partisil 5 SAX RAC II での分析では、HiTrapQ よりもさらに多くのピークが確認された。とくに、大腸菌 C 株 deON においてその傾向が顕著であり、HiTrapQ では 2 本の大きなピークが検出されたのに対し、Partisil では 9 本ものピークが検出された。HiTrapQ により同定された 4P、5P のピークに関しては、Partisil においても検出されたが、その他のピークは同定できなかつた。しかし、4P、5P と考えられるピークの周辺に多くのピークが検出されたことから、リン酸残基数が同じであっても、その置換位置が異なる分子種を分離することに成功したと考えられる。

また、Symmetry による逆相イオンペアクロマトグラフィーでは、イオン交換クロマトグラフィーとは全く異なるクロマトグラムが得られ、PS に含まれる 1P、2P、3P に対応するピークが検出された。再現性の確認も行えたものの、分析には高濃度のサンプルが必要であり、また、ピークの同定が困難であった。

つぎに、HPLC を用いて、ファージタンパク質との相互作用解析を行った。この方法は、ファージタンパク質と脱アシル化 LPS を混合し、遠心限外濾過により結合しなかつた

遊離の糖鎖画分を分離した後、その糖鎖画分の変化から結合した糖鎖の量を測定する方法である。HPLCにより濾液を分析し、クロマトグラムのピーク高さを用いて線形フィッティングを行った。このグラフから得られる50%結合濃度を親和性の指標とし、相互作用解析を行った。

大腸菌 C 株 deON および PS は、HiTrapQ、2 本連結 HiTrapQ、5 本連結 HiTrapQ を用いて相互作用解析を行い、大腸菌 C 株 deP deON、HF-1 $\alpha$ 、HF-2、大腸菌 K12 株 deON は、5 本連結 HiTrapQ を用いて相互作用解析を行った。以下に、PS と フェージタンパク質との相互作用解析の結果を示した (Table 6-1)。

Table 6-1 PS と フェージタンパク質との相互作用解析

分子種	50%結合 [cHisG] ( $\mu\text{M}$ )	50%結合 [HisH] ( $\mu\text{M}$ )
PS 2P EtN II	1.4 $\pm$ 0.3	0.15 $\pm$ 0.24
PS 1P I	2.3 $\pm$ 6.0	0.11 $\pm$ 0.60
PS 3P EtN II	3.2 $\pm$ 1.2	0.24 $\pm$ 0.33
PS 2P II	4.9 $\pm$ 0.4	0.22 $\pm$ 0.31
PS 3P II	6.4 $\pm$ 2.7	0.25 $\pm$ 0.34

PS と HisH との相互作用解析において、50%結合濃度は小さく、強い相互作用を示すが、それぞれの分子種に対し、親和性に大きな相違がないことがわかった。このことから、HisH は、PS の糖鎖を強く認識するものの、負電荷残基の数

が増えても相互作用には影響しないと考えられた。一方、cHisG との相互作用において、PS 2P EtN II では  $1.4 \pm 0.3$ 、PS 1P I では  $2.3 \pm 6.0$ 、PS 3P EtN II では  $3.2 \pm 1.2$ 、PS 2P II では  $4.9 \pm 0.4$ 、PS 3P II では  $6.4 \pm 2.7$  と異なる相互作用を示したことから、HisH と比較して、負電荷残基の影響を受けやすいと考えられた。以前の研究において、富田が Biacore を用いて LPS 脱リン酸誘導体と HisH、HisG (N 末端ヒスチジンタグ融合 G タンパク質) との相互作用解析を行い、LPS 脱リン酸誘導体と HisG との相互作用にはリン酸残基の数が影響するが、HisH との相互作用には顕著な差がないと報告している<sup>45-46)</sup>。本研究においても、HisH に比べ、cHisG では負電荷残基数が影響するという結果を得たことから、ヒスチジンタグの位置が異なるものの、H タンパク質に比べ G タンパク質では、負電荷残基から大きく影響を受けると判断された。

また、ファージの宿主にならない大腸菌 K12 株 deON におけるファージタンパク質の 50% 結合濃度が、ファージの宿主になる大腸菌 C 株 deON の 50% 結合濃度より小さくなるという結果が得られた (Table 6-2)。



Table 6-2 deON とファージタンパク質との相互作用解析

分子種	50 %結合 [cHisG] ( $\mu\text{M}$ )	50 %結合 [HisH] ( $\mu\text{M}$ )
大腸菌 C 株 deON 4P	$3.5 \pm 3.2$	$1.8 \pm 1.6$
大腸菌 C 株 deON 5P	$3.3 \pm 2.0$	$0.82 \pm 1.8$
大腸菌 K12 株 deON 4P	$1.0 \pm 1.0$	$1.6 \pm 0.21$
大腸菌 K12 株 deON 5P	$0.83 \pm 0.51$	$0.15 \pm 0.13$

このことから、ファージタンパク質と大腸菌 K12 株との親和性は、ファージタンパク質と大腸菌 C 株との親和性より強いことが示された。よって、ファージタンパク質は、大腸菌 K12 株の LPS を認識し結合吸着するものの、さらに次の段階であるエキリプスや DNA 挿入には至らないような結合の仕方をしていると推測された。

今後は、糖鎖長の異なる宿主や宿主でない種々の大腸菌由来の脱アシル化 LPS を用いて相互作用解析を行い、ファージタンパク質の認識をより詳細に評価することがひとつの課題としてあげられる。また、本研究の相互作用解析方法は、それぞれの分子種を単離することなく、それぞれの分子種とファージタンパク質との相互作用解析を行える点に大きな特徴を持っている。これは、分子種が混合した状態での測定のため、本研究で示した 50 % 結合濃度は、お互いの分子種が阻害物質として関与する状態で得られる値であり、見かけ上の値である。しかし、ファージが実際に感染する際には、菌の表層にある LPS は混合物の状態で存在

するため、これが真実に近い親和性を示していると考えられる。また一方、それぞれの分子種を単離した単体を用いて、相互作用解析を行うことにより、それぞれに固有の 50% 結合濃度が得られると考える。そして、それらの値を比較することにより、競合阻害が起きていることなどの確認ができると考えている。さらに、本研究で用いたフィッティング以外の方法により 50% 結合濃度を算出することで、より精度の高い親和性を算出できる可能性も考えられる。そのため、線形フィッティングの最適化を行うことも、今後の課題のひとつであると考ええる。

今後、さらに様々な方面から研究が行われ、バクテリオファージ  $\phi$ X174 の感染メカニズムが解明されることを期待したい。

## 第七章 実験の部

### 第一節 LPS の *O,N*-脱アシル化 (deON の調製)

LPS を蓋付き試験管に 100 mg 量り取り、4 N 水酸化カリウムを 10 mL 加えた。LPS が水酸化カリウムに完全に浸るように超音波処理を施しながら懸濁し、125℃のオイルバスで 18 時間加熱した。反応終了後、氷浴で冷却しながら 6 N 塩酸を用いて中和し、脂肪酸を析出させた。減圧濾過により脂肪酸を除去し、濾液を 200 mL 容三角フラスコに回収した。この溶液を 2 本の 50 mL 容コニカルチューブに分配し、そこへ等量のジクロロメタンを加えてよく混合することで、水層に残留した脂溶性物質を抽出除去した。その後、遠心分離 (4,800 rpm、20 分) し、水層を 100 mL 容ナスフラスコに移して減圧濃縮した。ここへ、超純水を 50 mL 加え、50 mL 容チューブに移し、再び遠心分離 (4,800 rpm、10 分) した。この水層に対し、PD-10 カラム (Pharmacia 社) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、糖鎖画分と塩化カリウムをおおよそ分離した。超純水で平衡化した PD-10 カラムにサンプルを 2.5 mL のせた後、5 mL の超純水で溶出し、100 mL ナスフラスコに糖鎖画分を回収した。その後、超純水を 15 mL 程度流し、塩を除去した。この操作を 50 mL 全量进行处理するまで繰り返し行った。得られた糖鎖画分を、減圧濃縮し、酢酸ピリジニウム緩衝液<sup>\*1</sup> 3 mL に溶解した。

さらに、完全に脱塩するため、Bio-gel P4 medium (BIO-RAD社) を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィー (1.5 cm × 120 cm) を行った。酢酸ピリジニウム緩衝液で平衡化した Bio-gel P4 medium にサンプルをのせ、120 滴 (約 3.3 mL) ずつ試験管に分取した。これらのうち、糖鎖画分をフェノール硫酸法<sup>\*2</sup>、塩画分を硝酸銀による沈殿生成法<sup>\*3</sup>により、検出した。糖鎖画分を 100 mL のナスフラスコに移して減圧濃縮して溶媒を除去した後、エタノールを加えて共沸させ、酢酸およびピリジンを完全に除去した。これを超純水に溶解して凍結乾燥し、O,N-脱アシル化体を得た。

\*1 : 酢酸ピリジニウム緩衝液

蒸留水 1500 mL にピリジン 6 mL、酢酸 15 mL を加え、0.45 nm の酢酸セルロースメンブランフィルターにより濾過した溶液

\*2 : フェノール硫酸法

試験管にサンプル 50  $\mu$ L、蒸留水 50  $\mu$ L、5% (w/v) フェノール 200  $\mu$ L を入れ、ボルテックスで混合した。そこへ、ディスペンサーで濃硫酸を 1 mL 加え、ボルテックスでよく混合した。常温まで放冷し、96 ウェルマイクロプレートに 200  $\mu$ L ずつ入れ、マイクロプレートリーダー Immuno Mini NJ-2300 (システムインスツルメンツ社) を用いて 490 nm の吸光度を測定した。

\*3 : 硝酸銀による沈殿生成法

96 ウェルマイクロプレートにサンプルを 100  $\mu$ L 入れ、

そこへ、10 mM 硝酸銀水溶液 100  $\mu$ L を滴下した。それを、マイクロプレートリーダーを用いて 630 nm の吸光度を測定した。

## 第二節 LPS の脱リン酸化 (deP deON の調製)

LPS を 100 mg 量り、スターラーバーの入ったポリエチレン製容器に入れ、氷中でよく冷却した。同時に、ドラフト内で、別のプラスチック容器に 48% フッ化水素酸を 5 mL 量り、LPS と同様に氷中でよく冷却した。十分に冷却した後、LPS にフッ化水素酸を 5 mL 加えた。このプラスチック容器を氷に挿したまま、4°C で 24 時間攪拌した。その後、反応溶液を透析チューブ (MWCO 1,000) に入れ、4°C において 500 mL の蒸留水に対して透析した。30 分程度毎に外液の pH を pH 試験紙で確認し、中性になるまで、適宜外液を交換した。その後、減圧濃縮して溶媒を除去し、超純水に溶解して凍結乾燥し、脱リン酸体 (deP deON) を得た。

## 第三節 LPS の弱酸加水分解 (PS の調製)

LPS を 100 mL 容ナスフラスコに 100 mg 量り取り、1% 酢酸 (v/v) を 10 mL 加えた。超音波処理により懸濁し、100°C のオイルバスで 2 時間加熱した。放冷した後、15 mL 容コニカルチューブに移し、遠心分離 (4,800 rpm、30 分) 後、

上清を 100 mL 容ナスフラスコに移した。沈殿に 1%酢酸を加えて洗浄し、遠心分離（4,800 rpm、30分）を行い、上清を回収した。これらの上清を減圧濃縮し、エタノールにより共沸することで酢酸を完全に除去した。その後、サンプルを 10%のグリセロールを含む酢酸ピリジニウム緩衝液に溶解し、Bio-gel P4 medium を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供した。第一節と同様に、フェノール硫酸法により糖鎖の検出を行い、糖鎖画分を回収した。エタノールとの共沸により、酢酸ピリジニウム緩衝液を除去し、再び超純水に溶解して凍結乾燥することで、弱酸加水分解物を得た。

#### **第四節 pQE-Fu による大腸菌の形質転換とタンパク質発現**

50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを添加した LB 寒天培地（1%トリプトン、0.5%乾燥酵母エキス、1%塩化ナトリウム、1.5%寒天）に、HisF を発現する JM109 株を塗布し、37°C で一夜倒置培養した。培養して得られたコロニーを楊枝でつつき、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを添加した LB 液体培地（1%トリプトン、0.5%乾燥酵母エキス、1%塩化ナトリウム）に植菌し、37°C で一夜振盪培養した。一夜培養液を遠心分離（10,000 rpm、5分）により 1.5 mL 容エッペンチューブに集菌した。集菌した菌体に 250  $\mu\text{L}$  の Solution I を加え、ポ

ルテックスでよく懸濁した。そこへ、250  $\mu$ L の Solution II を加え、4 回転倒混和し、5 分間室温でインキュベートした。その後、350  $\mu$ L の Solution III を加え、4 回転倒混和し、25 $^{\circ}$ C で遠心分離（13,000 rpm、10 分）した。得られた上清をスピncラムに移し、25 $^{\circ}$ C で遠心分離（13,000 rpm、1 分）した。濾液を除去した後、750  $\mu$ L の Column Wash Solution を加え、25 $^{\circ}$ C で遠心分離（13,000 rpm、1 分）し、濾液を除去した。再び、250  $\mu$ L の Column Wash Solution を加え、25 $^{\circ}$ C で遠心分離（13,000 rpm、2 分）し、洗浄した。新しい 1.5 mL 容エッペンチューブにスピncラムを移し、50  $\mu$ L の滅菌水を加え、25 $^{\circ}$ C で遠心分離（13,000 rpm、1 分）し、プラスミドを得た。

大腸菌 M15 株コンピタントセルを氷中で融解し、同時に、冷凍保存された SOC 培地を常温で融解した。コンピタントセルを氷上で融解した後、プラスミドを 1  $\mu$ L 加え、チップの先でゆっくりと攪拌した。氷中で 45 分静置した後、30 秒間、42 $^{\circ}$ C のヒートショックを与え、さらに 2 分間氷中で冷却した。そこへ、室温に融解した SOC 培地を 1 mL 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪培養した。振盪培養後、50  $\mu$ g/mL のアンピシリンおよび 12.5  $\mu$ g/mL のカナマイシンを添加した LB 寒天培地（1%トリプトン、0.5%乾燥酵母エキス、1%塩化ナトリウム、1.5%寒天）上に 100  $\mu$ L 播種し、37 $^{\circ}$ C で一夜倒置培養した。

翌日、寒天培地のコロニーを 4 個選択し、50  $\mu$ g/mL のア

ンピシリンおよび 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のカナマイシンを添加した LB 液体培地（1% トリプトン、0.5% 乾燥酵母エキス、1% 塩化ナトリウム）5 mL に、植菌した。OD<sub>600</sub> が 0.5 を超えるまで 37°C で振盪培養し、1 M IPTG を最終濃度で 0.5 mM になるように 2.5  $\mu\text{L}$  加え、さらに 3 時間振盪培養した。1.5 mL 容マイクロチューブに培養液を 500  $\mu\text{L}$  ずつ採取し、遠心分離（10,000 rpm、4°C、10 分）により集菌した。上清を除去した後、SDS-PAGE の 2×サンプルバッファーを 50  $\mu\text{L}$  加えて懸濁し、90°C で 5 分間煮沸処理を行った。12.5% アクリルアミドを用いて SDS-PAGE を行い、45,000 Da あたりのバンドを確認した。

## 第五節 Ni-NTA カラムによる HisF 可溶性画分の精製

pQE-Fu により形質転換された大腸菌 M15 株を、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンおよび 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のカナマイシンを添加した LB 液体培地 500 mL に植菌し、37°C で振盪培養した。OD<sub>600</sub> が 0.5 を超えるまで振盪培養し、1 M IPTG を最終濃度が 0.5 mM になるように 250  $\mu\text{L}$  加え、さらに 3 時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離（4,800 rpm、4°C、20 分）して集菌し、その菌体を破碎緩衝液（50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300 mM 塩化ナトリウム、pH 8.0）に懸濁した。その後、再度遠心分離（4,800 rpm、4°C、20 分）を行い洗菌した後、破碎緩衝液に懸濁し、一晩 -30°C で保存した。



菌体懸濁液を氷上で融解した後、超音波により破碎（1分；超音波処理、1分；氷上で冷却を20セット）し、遠心分離（4,800 rpm、4℃、20分）した。得られた上清に Ni-NTA を 2 mL 加えた後、1時間、振盪吸着させた。タンパク質が吸着した樹脂をカラムに充填し、0~200 mM のイミダゾールを含む破碎緩衝液を 4 mL ずつ流し、目的タンパク質を溶出・分取した。各画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE（12.5%）により確認した。

#### 第六節 Ni-NTA カラムによる HisF 不溶性画分の精製

pQE-Fu により形質転換された大腸菌 M15 株を、50 µg/mL のアンピシリンおよび 12.5 µg/mL のカナマイシンを添加した LB 液体培地 500 mL に植菌し、37℃ で振盪培養した。OD<sub>600</sub> が 0.5 を超えるまで振盪培養し、1 M IPTG を最終濃度が 0.5 mM になるように 250 µL 加え、さらに 3 時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離（4,800 rpm、4℃、20分）して集菌し、その菌体を破碎緩衝液に懸濁した。その後、再度遠心分離（4,800 rpm、4℃、20分）を行い洗菌した後、破碎緩衝液に懸濁し、一晚 -30℃ で保存した。

菌体懸濁液を氷上で融解した後、超音波により破碎（1分；超音波処理、1分；氷上で冷却を20セット）し、遠心分離（4,800 rpm、4℃、20分）した。上清を除去し、得られた沈殿に変性条件緩衝液（8 M 尿素、100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、

10 mM Tris- (hydroxymethyl) aminomethane、pH 8.0) を 5 mL 加え、超音波処理により可溶化した。可溶化した溶液を遠心分離 (4,800 rpm、4°C、20 分) し、上清に Ni-NTA を 2 mL 加えて 1 時間、振盪吸着させた。タンパク質が吸着した樹脂をカラムに充填し、8~0 M の尿素を含む緩衝液を 4 mL ずつながし、HisF の巻き戻しを行った。巻き戻した後、0~200 mM のイミダゾールを含む破碎緩衝液を 4 mL ずつ流し、目的タンパク質を溶出・分取した。各画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE (12.5 %) により確認した。

#### **第七節 DEAE セルロフィンカラムによる HisF の可溶性画分の精製**

pQE-Fu により形質転換された大腸菌 M15 株を、50 µg/mL のアンピシリンおよび 12.5 µg/mL のカナマイシンを添加した LB 液体培地 500 mL に植菌し、37°C で振盪培養した。OD<sub>600</sub> が 0.5 を超えるまで振盪培養し、1 M IPTG を最終濃度が 0.5 mM になるように 250 µL 加え、さらに 3 時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離 (4,800 rpm、4°C、20 分) して集菌し、その菌体を破碎緩衝液に懸濁した。その後、再度遠心分離 (4,800 rpm、4°C、20 分) を行い洗菌した後、破碎緩衝液に懸濁し、一晚 -30°C で保存した。

菌体懸濁液を氷上で融解した後、超音波により破碎 (1 分 ; 超音波処理、1 分 ; 氷上で冷却を 20 セット) し、遠心

分離（4,800 rpm、4℃、20分）した。得られた上清を透析膜（MWC0 8,000、BioDesign Inc. of New York 社）に入れ、10 mM NaPB（10 mM リン酸ナトリウム）（pH 7.4）に対し、4℃で一晩透析した。

カラムに DEAE セルロファイン 2 mL を充填し、10 mM NaPB（pH 7.4）20 mL により平衡化した。透析した HisF をカラムに流し、10 mM NaPB（pH 7.4）10 mL により洗浄した。その後、25～250 mM の塩化ナトリウムを含む 10 mM NaPB（pH 7.4）を 4 mL ずつ流し、目的タンパク質を溶出・分取した。各画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE（12.5%）により確認した。

## 第八節 DEAEセルロファインカラムによる HisF の不溶性画分の精製

pQE-Fu により形質転換された大腸菌 M15 株を、50 µg/mL のアンピシリンおよび 12.5 µg/mL のカナマイシンを添加した LB 液体培地 500 mL に植菌し、37℃で振盪培養した。OD<sub>600</sub> が 0.5 を超えるまで振盪培養し、1 M IPTG を最終濃度が 0.5 mM になるように 250 µL 加え、さらに 3 時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離（4,800 rpm、4℃、20分）して集菌し、その菌体を破碎緩衝液に懸濁した。その後、再度遠心分離（4,800 rpm、4℃、20分）を行い洗菌した後、破碎緩衝液に懸濁し、一晩-30℃で保存した。

菌体懸濁液を氷上で融解した後、超音波により破碎（1分；超音波処理、1分；氷上で冷却を20セット）し、遠心分離（4,800 rpm、4℃、20分）した。上清を除去し、得られた沈殿に変性条件緩衝液を5 mL加え、超音波処理により可溶化した後、遠心分離（4,800 rpm、4℃、20分）した。得られた上清を透析膜（MWCO 8,000、BioDesign Inc. of New York社）に入れ、6~0 Mまで段階的に尿素濃度を下げた変性条件緩衝液（6、4、2、0 M）に対して、常温で透析し、HisFを巻き戻した。その後、10 mM NaPB（pH 7.4）に対し、4℃で一晩透析した。

カラムに DEAE セルロファイン 2 mL を充填し、10 mM NaPB（pH 7.4）20 mL により平衡化した。透析した HisF をカラムに流し、10 mM NaPB（pH 7.4）10 mL により洗浄した。その後、25~250 mM の塩化ナトリウムを含む 10 mM NaPB（pH 7.4）を 4 mL ずつ流し、目的タンパク質を溶出・分取した。各画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE（12.5%）により確認した。

## 第九節 エタノール沈殿法による HisF の精製

DEAE セルロファインにより精製した画分に対し、エタノール沈殿を行った。1.5 mL 容エッペンチューブに HisF を含む画分を 100  $\mu$ L 加え、そこへ、0.25~2.5 倍量のエタノールを添加した。4 回転倒混和し、遠心分離（10,000 rpm、5

分)により、タンパク質の沈殿を得た。上清を除去し、得られた沈殿に 20  $\mu$ L の 2×サンプルバッファーを加え、よく混合した後、目的タンパク質を SDS-PAGE (12.5%) により確認した。

## 第十節 透析による HisF の精製

pQE-Fu により形質転換された大腸菌 M15 株を、50  $\mu$ g/mL のアンピシリンおよび 12.5  $\mu$ g/mL のカナマイシンを添加した LB 液体培地 500 mL に植菌し、37°C で振盪培養した。OD<sub>600</sub> が 0.5 を超えるまで振盪培養し、1 M IPTG を最終濃度が 0.5 mM になるように 250  $\mu$ L 加え、さらに 3 時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離 (4,800 rpm、4°C、20 分) して集菌し、その菌体を破碎緩衝液 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300 mM 塩化ナトリウム、pH 8.0) に懸濁した。その後、再度遠心分離 (4,800 rpm、4°C、20 分) を行い洗菌した後、破碎緩衝液に懸濁し、一晚 -30°C で保存した。

菌体懸濁液を氷上で融解した後、超音波により破碎 (1 分; 超音波処理、1 分; 氷上で冷却を 20 セット) し、遠心分離 (4,800 rpm、4°C、20 分) した。上清を除去し、得られた沈殿に変性条件緩衝液を 5 mL 加え、超音波処理により可溶化した後、遠心分離 (4,800 rpm、4°C、20 分) した。得られた上清を透析膜 (MWCO 8,000) に入れ、6~0 M まで段階的に尿素濃度を下げた変性条件緩衝液 (6、4、2、0 M)

に対して、常温でそれぞれ 10 時間以上透析し、HisF を巻き戻した。その後、10 mM NaPB (pH 7.4) に対し、4°C で一晩透析した。得られた沈殿と上清に対し、含まれるタンパク質を SDS-PAGE (12.5 %) により確認した。

## 第十一節 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた脱アシル化 LPS の分離

イオン交換クロマトグラフィーの溶離液は、A ラインに 10 mM NaPB (pH 7.4)、B ラインに 250 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM NaPB (pH 7.4) を用いて、蛍光発色液は、C ラインに 6 mM 過ヨウ素酸ナトリウムおよび 100 mM タウリンを含む溶液 (pH 7.0) を用いた。

イオンペアクロマトグラフィーの溶離液は、A ラインに 15 mM リン酸および 5 mM トリブチルアミンを含む溶液 (pH 7.0)、B ラインにアセトニトリルを用いて、蛍光発色液は、C ラインに 6 mM 過ヨウ素酸ナトリウムおよび 100 mM タウリンを含む溶液 (pH 7.0) を用いた。

まず、カラムの平衡化および蛍光検出器ランプの安定化のため、1 時間以上システム内を洗浄した。蛍光検出器が安定した後、脱アシル化 LPS を分析する場合と同じ条件でベースラインを測定した。蛍光検出器が安定化していることを確認した後、脱アシル化 LPS の分析を行った。

脱アシル化 LPS を 1 mg/mL になるように A ラインの溶液

に溶解したサンプルを 20  $\mu\text{L}$  注入した。A、B ラインの溶液によりグラジエント溶出した後、C ラインと混合し、0.5 mm $\phi$   $\times$  10 m の渦巻きステンレス管を通して 100 $^{\circ}\text{C}$  の反応オーブンを約 4 分通過させることで誘導体化した。これにより、脱アシル化 LPS はカラムによって分離後、蛍光発色団を持つ化合物に変換され、励起波長  $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ 、蛍光波長  $\lambda_{\text{ex}} = 430 \text{ nm}$  の条件で、クロマトグラムとして検出した。

## 第十二節 HPLC を用いた脱アシル化 LPS とフェージタンパク質との相互作用解析

脱アシル化 LPS を 1 mg/mL になるように 10 mM NaPB (pH 7.4) に溶解し、サンプルを調製した。限外濾過膜 (MWCO 10,000) のついた 1.5 mL 容マイクロチューブ (Amicon 社) に、10 mM NaPB で希釈したフェージタンパク質を 100  $\mu\text{L}$  ずつ加えた。そこへ、脱アシル化 LPS を 100  $\mu\text{L}$  ずつ加え、よく混合した後、10 分間常温で静置した。その後、遠心限外濾過 (10,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分) し、濾液として得られた低分子画分を HPLC バイアルに移し、20  $\mu\text{L}$  を HPLC に注入して、分析した。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、研究の進め方や様々な問題に対して多くの御助言・御指導を頂き、また、論文審査において主査をして頂いた、三重大学大学院生理活性化学研究室の稲垣穰教授に心より御礼申し上げます。

論文審査において副査をして頂いた、三重大学大学院生物機能化学研究室の今井邦雄教授、三重大学大学院分子生物情報学研究室の田中晶善教授に深く感謝致します。

質量分析において大変お世話になりました、三重県工業研究所主任研究員の山崎栄次氏、株式会社日本点眼薬研究所の小島久毅氏に深く感謝致します。

様々な面から研究生活を支えて頂きました、研究室の諸先輩方、ともに成長した同輩、支えて頂いた後輩に深く感謝致します。

最後に、6年間の大学生活を温かく見守り、支えてくれた家族に深く感謝致します。



## 参考文献

- 1) Brown, D. T., J. M. McKenzie and M. E. Bayer. *J. Virol.*, 7 (6) (1971) 836-846
- 2) Sanger, F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, J. C. Fiddes, C. A. Hutchison III, P. M. Slocombe and M. Smith. *Nature*, 265 (1977) 687-695
- 3) Sanger, F., A. R. Coulson, T. Friendmann, G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, J. C. Fiddes, C. A. Hutchison III, P. M. Slocombe and M. Smith. *J. Mol. Biol.*, 125 (2) (1978) 225-246
- 4) Air, G. M., A. R. Coulson, J. C. Fiddes, T. Friendmann, C. A. Hutchison III, F. Sanger, , P. M. Slocombe and A. J. H. Smith. *J. Mol. Biol.*, 125 (2) (1978) 247-254
- 5) Sanger, F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, J. C. Fiddes, C. A. Hutchison III, P. M. Slocombe, M. Smith, J. Drouin, T. Friendmann and A. J. H. Smith. (eds. by Denhardt, D. T., D. Dressler and D. S. Ray, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) (1978) 659-669
- 6) Hayashi, M., A. Aoyama, D. L. Richardson Jr. and M. N. Hayashi. (ed. by Calendar, R., Plenum Press, New York and London) Volume 2 (1988) 1-71
- 7) 林多紀  $\phi$ X174 バクテリオファージの遺伝子. 蛋白質・

核酸・酵素、21 (3) (1976) 192-204

- 8) Tessman, E. S. and I. Tessman. (eds. by Denhardt, D. T., D. Dressler and D. S. Ray, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) (1978) 9-29
- 9) Edgell, M. H., C. A. Hutchison III and R. L. Sinsheimer. *J. Mol. Biol.*, 42 (3) (1969) 547-557
- 10) Shank P. R., C. A. Hutchison III and M. H. Edgell. *Biochemistry*, 16 (21) (1977) 4545-4549
- 11) Burgess, A. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 64 (2) (1969) 613-617
- 12) Bayer, M. E. and R. W. Deblois. *J. Virol.*, 14 (4) (1974) 975-980
- 13) Bayer, M. E. and T. W. Starkey. *Virology*, 49 (1) (1972) 236-256
- 14) 川浦知子 三重大学大学院生物資源学研究所修士論文 (1999年度)
- 15) Jazwinsky, S. M., A. A. Lindberg and A. Kornberg. *Virol.* 66, (1975) 283-293
- 16) Newbold, J. E. and R. L. Sinsheimer. *J. Mol. Biol.*, 49 (1) (1970) 49-66
- 17) Incaedona, N. L., R. Blonski and W. Feeney. *J. Virol.*, 9 (1) (1972) 96-101
- 18) McKenna, R., L. L. Ilag, M. G. Rossman. *J. Mol. Biol.*, 237 (1994) 517-543

- 19) Lindberg, A. A. Bacteriophage Receptors. *Ann. Rev. Microbiol.*, 27 (1973) 205-241
- 20) Lindberg, A. A. Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell. Chapter 8. (1977) 289-356
- 21) 中野昌康、小玉正智 エンドトキシンー新しい治療・診断・検査ー、講談社サイエンティフィック (1995)
- 22) 遠藤重厚、稲田捷也 エンドトキシンと病態、へるす出版 (1995)
- 23) 加藤巖 生物トキシン、学会出版センター (1988)
- 24) 川田十三夫、久恒和仁 細菌毒素研究、11、共立出版株式会社 (1976) 229-243
- 25) E. T. Rietschel, L. Brade, B. Linder, U. Zähringer, in D.C. Morrison, L. Ryan (Editors) ,Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, CRC Press, Boca Raton, 1992, 3
- 26) M. Vaara, *Microbiol. Rev.* 56 (1995) 33
- 27) 本間遜、斉藤和久、河西信彦、丹羽充 細菌内毒素、講談社 (1973)
- 28) Conrat, H. F., Kimball, P. C. ウイルス学, 東京化学同人 (1985)
- 29) 関口学 三重大学生物資源学部卒業論文 (2006年度)
- 30) 大江健介 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文 (2006年度)
- 31) 鈴木亮子 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文 (1998年度)

- 32) U. Feige, S. Stirm, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71  
(2) (1976) 66-573
- 33) 小島久毅 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文  
(1991年度)
- 34) 小木曾直人 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文  
(1992年度)
- 35) 佐藤正和 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文  
(1994年度)
- 36) Schmidt, G., Jann. B., Jann, K., *Eur. J. Biochem.*, 10(1969)  
501-510
- 37) 貝谷康治 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文  
(1993年度)
- 38) 若嶋裕人 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文  
(2001年度)
- 39) 加藤宗春 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文  
(1998年度)
- 40) 若嶋裕人 三重大学生物資源学部卒業論文(1999年度)
- 41) 稲垣穰ら 農芸化学会大会要旨(2000年度)
- 42) 上総泰子 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文  
(2001年度)
- 43) 浜野友絵 三重大学生物資源学部卒業論文(2003年度)
- 44) 富田剛史 三重大学生物資源学部卒業論文(2004年度)
- 45) 小島久毅 三重大学大学院生物資源学研究科博士論文  
(2009年度)

- 46) 富田剛史 三重大学大学院生物資源学研究科修士論文  
(2006年度)
- 47) 渡邊照子 三重大学生物資源学部卒業論文(2007年度)
- 48) 餅原大祐 三重大学生物資源学部卒業論文(2007年度)
- 49) Honda, S. *J. Chromatogr. A*, 720: 183-199 (1996)