

第7章

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

本章に関する研究内容に関して、特許を申請した。
以下にその明細書を収録した。

【書類名】 特許願
 【整理番号】 MT060905-1
 【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願
 【あて先】 特許庁長官殿
 【発明者】
 【住所又は居所】 三重県津市栗真町屋町1577三重大学大学院生物資源学研究科内
 【氏名】 稲垣 穰
 【発明者】
 【住所又は居所】 三重県津市栗真町屋町1577三重大学大学院生物資源学研究科内
 【氏名】 大江 健介
 【特許出願人】
 【識別番号】 304026696
 【住所又は居所】 三重県津市栗真町屋町1577
 【氏名又は名称】 国立大学法人三重大学
 【代表者】 三重大学長 豊田 長康
 【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項1】

バクテリオファージ ϕ X174のGタンパク質において、当該のGタンパク質は5量体であることを特徴とするGタンパク質。

【請求項2】

C末端にヒスチジンタグを持たせることによって5量体を形成することを特徴とする請求項1記載Gタンパク質の製造方法。

【請求項3】

請求項1記載Gタンパク質を用いることを特徴とする特定大腸菌増殖の抑制方法。

【請求項4】

請求項1記載Gタンパク質を用いることを特徴とする特定大腸菌の検出方法。

【請求項5】

特定大腸菌がC株大腸菌であることを特徴とする請求項3及び4に記載の抑制方法及び検出方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 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

【技術分野】

【0001】

本発明は、バクテリオファージに由来し大腸菌の増殖を抑制するスパイクGタンパク質5量体及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、バクテリオファージゲノミクスに基づき新規のタンパク質を作製し、当該のタンパク質を用いて特定の細菌と結合させ、その細菌の繁殖を防ぐ技術が報告されている。例えば特許文献特表2002-531107がある。又、特定の細菌を検出する方法としてバクテリオファージに蛍光性タンパク質を融合する技術が公知であり、例えば特開2004-283003がある。又、 ϕ X174のスパイクGタンパク質のN末端にヒスチジンタグ配列を連結した組み替えタンパク質の調製技術が公知であり、例えば、非特許文献1及び2が知られている。

【0003】

【特許文献1】 特表2002-531107号公報

【特許文献2】 特開2004-283003号公報

【非特許文献1】 Kawaura, T., Inagaki, M., Kariata, S., Kato, M., Nishikawa, S., Kashimura, N., Recognition of receptor lipopolysaccharides by spike G protein of bacteriophage ϕ X174, Biosci. Biotechnol. Biochem., 64 (9), 1993-1997 (2000).

【非特許文献2】 Inagaki, M., Kawaura, T., Wakashima, H., Kato, M., Nishikawa, S., Kashimura,

N., Different contributions of the outer and inner R-core residues of lipopolysaccharide to the recognition by spike H and G proteins of bacteriophage ϕ X174, FEMS Microbiol. Lett., 226 (2), 221-227 (2003).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

前記特許文献1において、Staphylococcus aureusバクテリオファージ77、3A、96、44AHJ D、Enterococcusバクテリオファージ182、Streptococcus pneumoniaeバクテリオファージDp-1を利用した記載があるが、大腸菌ファージ ϕ X174及びその遺伝子を、抗菌を目的に利用した技術はなかった。特許文献2において、大腸菌O157及びK12と特異的に吸着する、標識されたバクテリオファージを用いてそれらの大腸菌を検出する技術に関する記載があるが、大腸菌C株を検出する技術はなかった。

【0005】

又、N末端にヒスチジンタグ配列を連結したスパイクGタンパク質(HisG)は、ヒスチジンタグ配列が立体的な障害になり、5量体を形成できないことが知られている(非特許文献1及び2)。それに対して本発明は、良好に5量体を形成し、5量体の中心部に菌の内部と外部を繋ぎえる通路を備える、新規5量体Gタンパク質(cHisG)によって上記課題を解決するものである。

【0006】

大腸菌には多数の種類があり、大腸菌C株は人体への影響がほとんど無いが、特定の大腸菌の増殖をコントロールしたり、検出することは大腸菌やバクテリオファージ等の研究を進める場合極めて重要な意味を持っている。又、本発明をさらに発展させることによって、新しい診断薬や遺伝子組み換え等の生命科学における重要な技術を開発できる可能性が高い。

【課題を解決するための手段】

【0007】

バクテリオファージ ϕ X174のGタンパク質において、当該のGタンパク質は5量体となっていることを特徴とする。

【0008】

C末端にヒスチジンタグを持たせることによって5量体を形成することを特徴とするGタンパク質5量体の製造方法である。

【0009】

当該のGタンパク質5量体を用いることを特徴とする特定大腸菌増殖の抑制方法である。

【0010】

当該のGタンパク質5量体を用いることを特徴とする特定大腸菌の検出方法である。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、従来報告の無い大腸菌C株について、その増殖の抑制や検出が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

バクテリオファージ ϕ X174は、ミクロウイルス科に属する小型正二十面体ウイルスで、*Escherichia coli* (大腸菌)、*Salmonella* (サルモネラ菌)、*Shigella* (赤痢菌を含む)などのグラム陰性の腸内細菌科の中で、菌体の表面を覆っているリポ多糖のコア糖鎖が完全に保存されたRa型菌に好んで感染し、その感染スペクトル域が狭いことが特徴の1つである。

【0013】

バクテリオファージ ϕ X174は、正二十面体の12カ所の頂点にスパイクと呼ばれる突起を持っており、宿主菌に感染する際には、そのスパイク部分で菌体に結合することにより、特定の細菌を選び出して感染し、その細菌内部で増殖し、ついには、その細菌を破壊(溶菌)して外へ出てくる。

【0014】

従来は、バクテリオファージの持つ溶菌タンパク質などの細菌障害性タンパク質あるいは、その遺伝子を利用する技術があった。しかし、そうした細菌障害性タンパク質は、細菌に感染侵入したバクテリオファージが細菌内で増殖した後に発現作用するものであって、バクテリオファージの一番の特徴である厳密に細菌を選択する能力には、関与していない。

【0015】

つまり、数多くの細菌のなかから、標的とする細菌だけをまさに精密に選択するためには、スパイクを構成するタンパク質を利用する必要がある。

【0016】

バクテリオファージ ϕ X174粒子のスパイクにGタンパク質が含まれる場合には、その5量体の中

心部分の孔は、他のタンパク質でふさがっており、これが菌体表面と結合して変形することによって、いわば栓が抜け、内部のファージDNAが飛び出す仕組みである。

【0017】

そこで、Gタンパク質のみを遺伝子工学的に大量に調製し、かつ、取り出した溶液中で5量体構造を取り得るとしたら、その5量体Gタンパク質の中央部に孔が空き、その孔は5量体Gタンパク質が細菌の膜に突き刺さった時には、内部物質の流出孔として機能すると推定できる。したがって、5量体スパイクGタンパク質を細菌に対して投与するならば、細菌を死に至らしめる、あるいは、増殖を抑制する抗菌性物質として機能すると考えられる。

【0018】

本発明では、当該遺伝子を含有する組み換えベクターを調製し、当該ベクターをコンピタントセルに導入して形質転換体を作成する。そして、その形質転換体の培養物から5量体スパイクGタンパク質を精製することができる。

具体的に本発明によるタンパク質の作成方法の概要を以下に示す。

【0019】

(新規5量体スパイクGタンパク質をコードする遺伝子のクローニング)

本発明のタンパク質の遺伝子のクローニングは、次のようにして行った(図1)。発現ベクターpQE60(キアゲン社)にGタンパク質をコードするDNA断片を挿入するために、バクテリオファージφX174RF DNA(東洋紡社)を鋳型とするPCR法により目的遺伝子領域を増幅した。

【0020】

使用したプライマーは、Gタンパク質遺伝子の開始コドンの上流にAflIII切断サイト(ACATGT)を導入するためのフォワードプライマー: 5'-AAACATGTTTCAGACTTTTATT-3'、及び、Gタンパク質遺伝子の停止コドンを削除し、そのすぐ下流にBamHI切断サイト(CCTAGG)を導入するためのリバースプライマー: 5'-AAGGATCCCTTAAGTGGCTG-3'を用いた。

【0021】

増幅されたGタンパク質遺伝子断片をpCR2.1(インビトロジェン社)に対してTAクローニングを行い、コンピタントセル大腸菌INVα株(インビトロジェン社)を形質転換した。形質転換菌をX-galを含むLB寒天培地上でカラーセレクションし、目的のGタンパク質遺伝子をもつ組み替え体を選抜し、プラスミドの塩基配列を確認した。

【0022】

塩基配列が確認されたプラスミドをBamHI及びAflIIIにより切断し、得られたDNA断片をpQE-60(キアゲン社)のBamHI及びNcoIサイトに連結して、目的タンパク質の発現のためのプラスミドpQEcGを得た。

【0023】

さらに、大腸菌JM109株をpQEcGにより形質転換し、選抜した組み替え体からプラスミドを得て、全塩基配列とそれにコードされた全アミノ酸配列が目的のタンパク質の配列と一致することを確認した。

【0024】

(pQEcGを持つ大腸菌によるcHisGタンパク質の発現)

タンパク質の発現は次のようにして行う(図2)。50μg/mLのアンピシリンナトリウムを含むLB液体培地中において、対数増殖期前期にまで培養したpQEcGを持つ大腸菌JM109株に対して、終濃度0.3mMになるようにIPTGを添加し、以後1時間毎に培養液を250μL採取して集菌し、その菌体に含まれるタンパク質を通常法によるSDS/PAGEにより確認した。

【0025】

pQEcGを持つ大腸菌JM109株は、IPTG添加前には目的タンパク質に対応する22kDaのバンドが認められないが、IPTG添加後には、1、2、3、5時間が経過するにつれ目的のタンパク質バンドが発現・蓄積することが確認された。

【0026】

(cHisGの精製)

Ni-NTA(Ni-ニトロトリ酢酸)ゲルによる親和性クロマトグラフィーによるcHisGの精製を通常法に従って行った(図3)。50μg/mLのアンピシリンナトリウムを含む250mLのLB液体培地中で、pQEcGによって形質転換された大腸菌JM109株を対数増殖期前期にまで培養し、終濃度0.3mMになるようにIPTGを添加し、37℃で5時間振盪培養し、5000×g、10分間遠心分離を行い集菌した菌体を破碎緩衝液(300mM塩化ナトリウム及び10mMイミダゾールを含む50mMナトリウムリン酸緩衝液pH8.0)に懸濁し、-30℃で一晩、凍結保存した。

【0027】

凍結した菌体懸濁液を氷上で融解し、超音波照射によって粉碎し、 $10000 \times g$ で30分間遠心分離を行い上清を採取した。あらかじめ破碎緩衝液で平衡化した約3 mLのNi-NTAゲルをこの上清に加え、1時間氷上で攪拌し、目的タンパク質をゲルに吸着させた。

【0028】

タンパク質が吸着したゲルをカラム(15 mm ϕ \times 7 cm)に充填し、破碎緩衝液を流速0.5 mL/分で流出液の280 nmにおける吸光度が0.01以下になるまで流し、さらに、洗浄緩衝液(300 mM塩化ナトリウム及び20 mMイミダゾールを含む50 mMナトリウムリン酸緩衝液pH7.0)を同様に流出物の280 nmにおける吸光度が0.01以下になるまで流した。

【0029】

0.05~0.5 Mの10段階のイミダゾール濃度勾配を含む40 mLの洗浄緩衝液を用いて目的タンパク質を溶出し、溶出画分に含まれるタンパク質を通常法によるSDS/PAGEにより確認し、目的タンパク質を含む分画を回収した。

【0030】

CM-セルロファインC-500 m陽イオン交換クロマトグラフィーによりcHisGを精製した(図4)。Ni-NTA親和性クロマトグラフィーより得られた、cHisGを含む分画を10 mMナトリウムリン酸緩衝液(pH7.0)に対して一晩透析した。

【0031】

10 mMナトリウムリン酸緩衝液(pH7.0)で予め平衡化した、約6 mLのCM-セルロファインC-500 mゲルを充填したカラム(15 mm ϕ \times 7 cm)に、上述のcHisGを含む分画を添加し、10 mLの10 mMナトリウムリン酸緩衝液(pH7.0)でカラムを洗浄した。0.1~1.0 Mの10段階の塩化ナトリウム濃度勾配を含む10 mLの10 mMナトリウムリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて、目的タンパク質を溶出し、溶出画分に含まれるタンパク質を通常法によるSDS/PAGEにより確認し、目的タンパク質を含む分画を回収した。

【0032】

(新規Gタンパク質(cHisG)の5量体形成に関する解析)

SDS/PAGEによってGタンパク質の5量体を観察した(図5)。SDSサンプル緩衝液5 μ LにcHisG溶液(1.17 mg/mL)5 μ Lを混ぜ、加熱する、あるいは加熱せずにその3 μ Lを電気泳動に供した。標準分子量マーカーは、SDS/PAGE用タンパク質マーカー(10倍濃縮)(ナカライテスク社)を使用した。

【0033】

その結果、加熱せずに泳動したGタンパク質(cHisG)は、110 kDa付近に単一のバンドが確認された。これは、単量体のGタンパク質の分子量である、22 kDaの丁度5倍の分子量であり、このことから、Gタンパク質(cHisG)は、溶液中で5量体を形成していることが示唆された。

【0034】

次に、Native/PAGEを用いて、SDS非存在下での新規Gタンパク質(cHisG)の溶液内均一性を観察した(図6)。SDSが含まれていないNative/PAGEサンプル緩衝液5 μ Lに対して、新規Gタンパク質(cHisG)(58.6 μ M)溶液5 μ Lを混合し、その3 μ Lを電気泳動に供した。

【0035】

又、比較対象として、非特許文献1に記載されている方法によって調製した、N末端にヒスチジンタグ配列を連結したGタンパク質(HisG)(43 μ M)を同様の操作で電気泳動に供した。さらに、主に単量体として、一部二量体として存在することが一般的に知られているタンパク質として牛血清アルブミン(BSA)(ナカライテスク社)(5 mg/mL)を同様の操作で電気泳動に供した。

【0036】

その結果、N末端にヒスチジンタグ配列を連結したGタンパク質(HisG)では、1から3量体に対応する複数種類のタンパク質バンドが確認されたのに対して、新規Gタンパク質(cHisG)は単一の大きなバンドが確認された。これによって、新規Gタンパク質(cHisG)は、溶液内で従来のGタンパク質(HisG)よりも大きなサイズのただ一種類の多量体を形成していることが判った。

【0037】

上述の2種類の電気泳動実験(SDS/PAGE、Native/PAGE)の結果から、新規Gタンパク質(cHisG)は溶液内で5量体を形成している可能性が示唆されたため、cHisGをセファクリルS-200高分解能カラム(16 mm ϕ \times 60 cm)を用いたゲルろ過分析に供し、分子量を推定した。

【0038】

あらかじめTBS(100 mMの塩化ナトリウムを含む50 mMトリス塩酸緩衝液pH7.4)で平衡化したゲルろ過カラムに対して、1 mLのcHisGを含むTBS溶液(1.17 mg/mL)、又

は、分子量標準マーカーとなるチログロブリン、 γ -グロブリン、オボアルブミン、ミオグロビン、ビタミンB12を含む、ゲル濾過標準試料（バイオラッド社）を添加して、流速0.40mL/分でTBSを流した。標準試料の分子量の対数（log分子量）をX軸として、分配係数K_{av}をY軸として描いた検量線（図7）を得て、cHisGの分配係数からその分子量を比較推定した。

【0039】

その結果、cHisGは、約117kDaに相当する位置に溶出され、ゲル濾過法によっても、本発明の新規Gタンパク質（cHisG）が溶液中で5量体を形成していることを確認できた。

【実施例】

【0040】

以下に本発明の好適な実施の形態を実施例によって説明するが、本発明の技術的範囲は下記の実施形態によって限定されるものでなく、その要旨を変更することなく様々に改変して実施することができる。

（大腸菌C株の増殖抑制）

5量体スパイクGタンパク質は、バクテリオファージ ϕ X174が宿主菌に感染する際にファージ遺伝子を通す通路として働くと考えられている。従って、本発明によって得られた溶液内で5量体を形成する能力を有する新規Gタンパク質（cHisG）は、宿主大腸菌C株の膜に突き刺さり、その中心部の孔から細菌の内容物が流出する結果、大腸菌を死滅させる、あるいは、増殖を阻害する能力があると考えられる。

【0041】

-80℃に保存した大腸菌C株フリーズストックを1白金耳取り、5mLのLB液体培地に植菌して、37℃で約3.5時間、600nmにおける吸光度が0.45になるまで振盪培養した。この培養液をLB液体培地で段階希釈し、 2.25×10^3 cfu/mLの大腸菌が存在するように調整した。希釈した菌体液100 μ LにcHisGを終濃度で20 μ M、及び27 μ Mになるように添加し、これらを37℃で30分保温した。

【0042】

その後、混合物を新しいLB寒天培地にまき、37℃で一夜培養した。20 μ MのcHisGタンパク質を加えた場合には、大腸菌C株のコロニーが減る傾向が見られた。又、27 μ MのcHisGタンパク質を加えた場合には、大腸菌C株のコロニーはわずか2個に減少した。これらの結果は、5量体スパイクGタンパク質が大腸菌C株の増殖を顕著に抑制する能力をもつことを示す。

【0043】

本発明による新規5量体Gタンパク質は、宿主細菌の膜に突き刺さり、5量体の中心に空いた孔から菌の内容物を流出させることを作用機作として、菌の増殖を20 μ Mの濃度で中程度に、そして、27 μ Mの濃度でほぼ完全に抑制する。

【0044】

これまで、長い生物の歴史上でバクテリアに感染するファージが継続的に存在してきた事実を考えると、本発明の5量体スパイクGタンパク質に対して、細菌が耐性を獲得する可能性は極めて低いと考えられ、従って、本発明による新規5量体スパイクGタンパク質は、これまでにない新しい方法論によって特定の細菌の増殖を抑制することを可能にした、極めて有用な抗菌物質になる。

【産業上の利用可能性】

【0045】

本発明による5量体スパイクGタンパク質は、例えば次のようにして利用することができる。食品、若しくは飲料に当該タンパク質を添加する、当該タンパク質を含有する溶液を抗菌作用を発揮させたい対象にスプレー等を用いて噴霧する、当該タンパク質を含有する溶液に食器、布、若しくは器具等を浸漬する、又は当該タンパク質を含有する乳液を、物質や皮膚に塗布する等が挙げられる。

【0046】

又、本発明のcHisGに対して、FITCやダンシルによる蛍光誘導体化、あるいは、ビオチン修飾などを施すことによって、顕微鏡下や試験管内あるいは、多孔試験プレート上において、蛍光を発する性質を利用する、あるいは、ビオチン-アビジン反応を利用するなどにより、特定の細菌を検出する方法に応用することもできる。

【0047】

さらに、本発明の利用形態は、そのタンパク質であることに由来する水溶性や生分解性、毒性や抗原性が事実上無視できる特性、あるいは、特定の宿主菌に優れた選択性を示す特性を活かして利用されるのであれば、上記に限られるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】バクテリオファージ ϕ X174由来の5量体スパイクGタンパク質を遺伝子工学的手法により、組み換え大腸菌JM109株において大量発現するための発現プラスミドを作成する方法を示す

概略図である。

【図2】 pQEcGによって形質転換された大腸菌JM109株に対してIPTGによる組み替えタンパク質誘導と発現の経時的変化を示すSDS/PAGEの写真である。

【図3】 Ni-NTA (Ni-ニトリロトリ酢酸) 親和性クロマトグラフィーによるGタンパク質の精製過程を分析したSDS/PAGEの写真である。

【図4】 CM-セルロファインC-500m陽イオン交換クロマトグラフィーによるGタンパク質の精製過程を分析したSDS/PAGEの写真である。

【図5】 SDS/PAGEによりスパイクGタンパク質5量体が形成されていることを確認した結果を示す写真である。

【図6】 5量体スパイクGタンパク質(cHisG)と5量体を形成しない従来のGタンパク質(HisG)をNative/PAGEによって比較分析した結果を示す写真である。

【図7】 5量体スパイクGタンパク質(cHisG)の分子量をゲルろ過によって推定したグラフである。

【図8】 5量体スパイクGタンパク質(cHisG)による大腸菌C株に対する増殖抑制効果を確認した結果を示す写真である。

【配列表】

<110>国立大学法人三重大学

<120>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

<160>2

<210>1

<211>185

<212>アミノ酸

<213>バクテリオファージφX174

<400>

```
Met Phe Gln Thr Phe Ile Ser Arg His Asn Ser Asn Phe Phe Ser Asp 16
Lys Leu Val Leu Thr Ser Val Thr Pro Ala Ser Ser Ala Pro Val Leu 32
Gln Thr Pro Lys Ala Thr Ser Ser Thr Leu Tyr Phe Asp Ser Leu Thr 48
Val Asn Ala Gly Asn Gly Gly Phe Leu His Cys Ile Gln Met Asp Thr 64
Ser Val Asn Ala Ala Asn Gln Val Val Ser Val Gly Ala Asp Ile Ala 80
Phe Asp Ala Asp Pro Lys Phe Phe Ala Cys Leu Val Arg Phe Glu Ser 96
Ser Ser Val Pro Thr Thr Leu Pro Thr Ala Tyr Asp Val Tyr Pro Leu 112
Asn Gly Arg His Asp Gly Gly Tyr Tyr Thr Val Lys Asp Cys Val Thr 128
Ile Asp Val Leu Pro Arg Thr Pro Gly Asn Asn Val Tyr Val Gly Phe 144
Met Val Trp Ser Asn Phe Thr Ala Thr Lys Cys Arg Gly Leu Val Ser 160
Leu Asn Gln Val Ile Lys Glu Ile Ile Cys Leu Gln Pro Leu Lys Gly 176
Ser Arg Ser His His His His His His 185
```

<210>2

<211>558

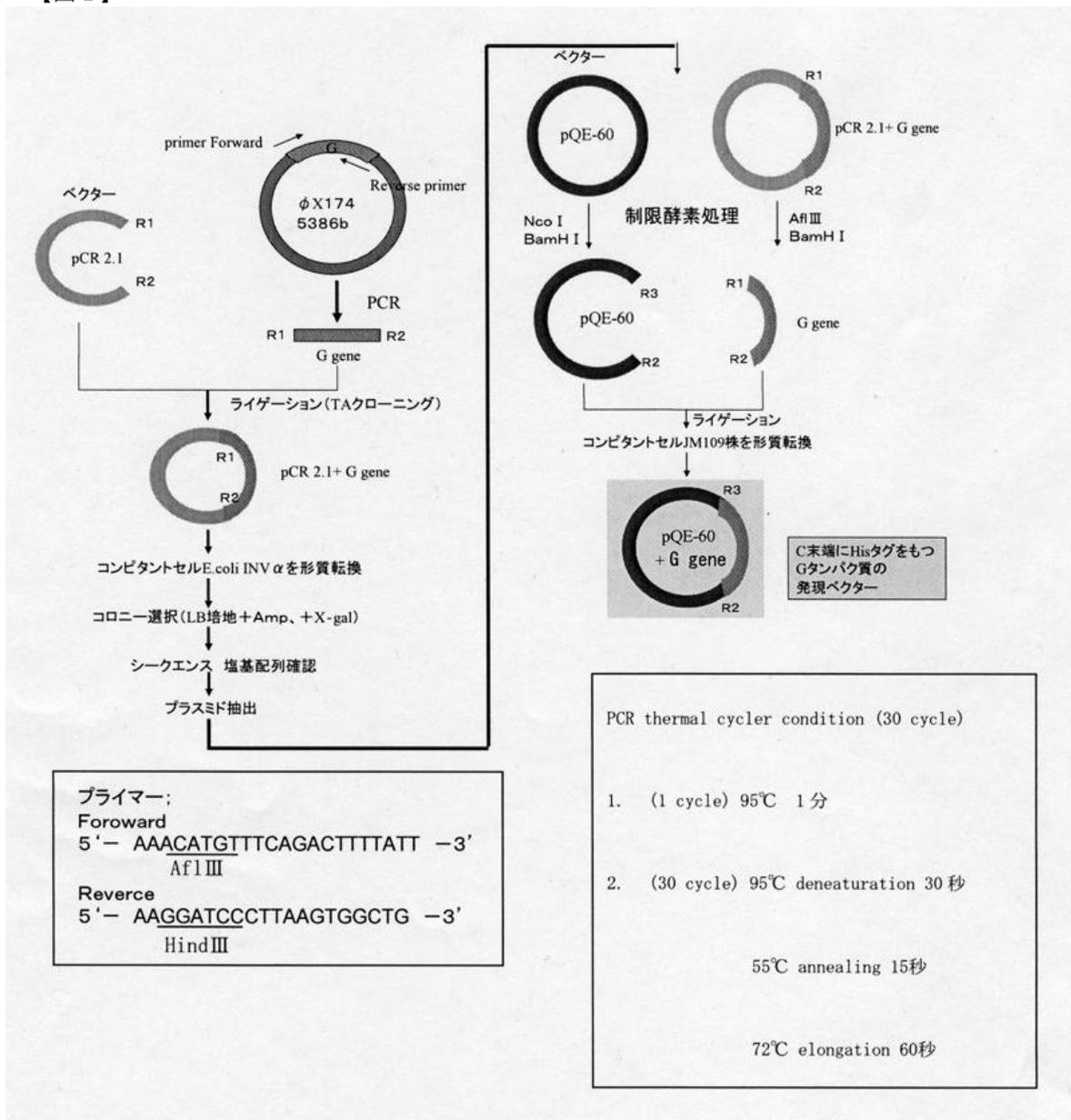
<212>DNA

<213>バクテリオファージφX174

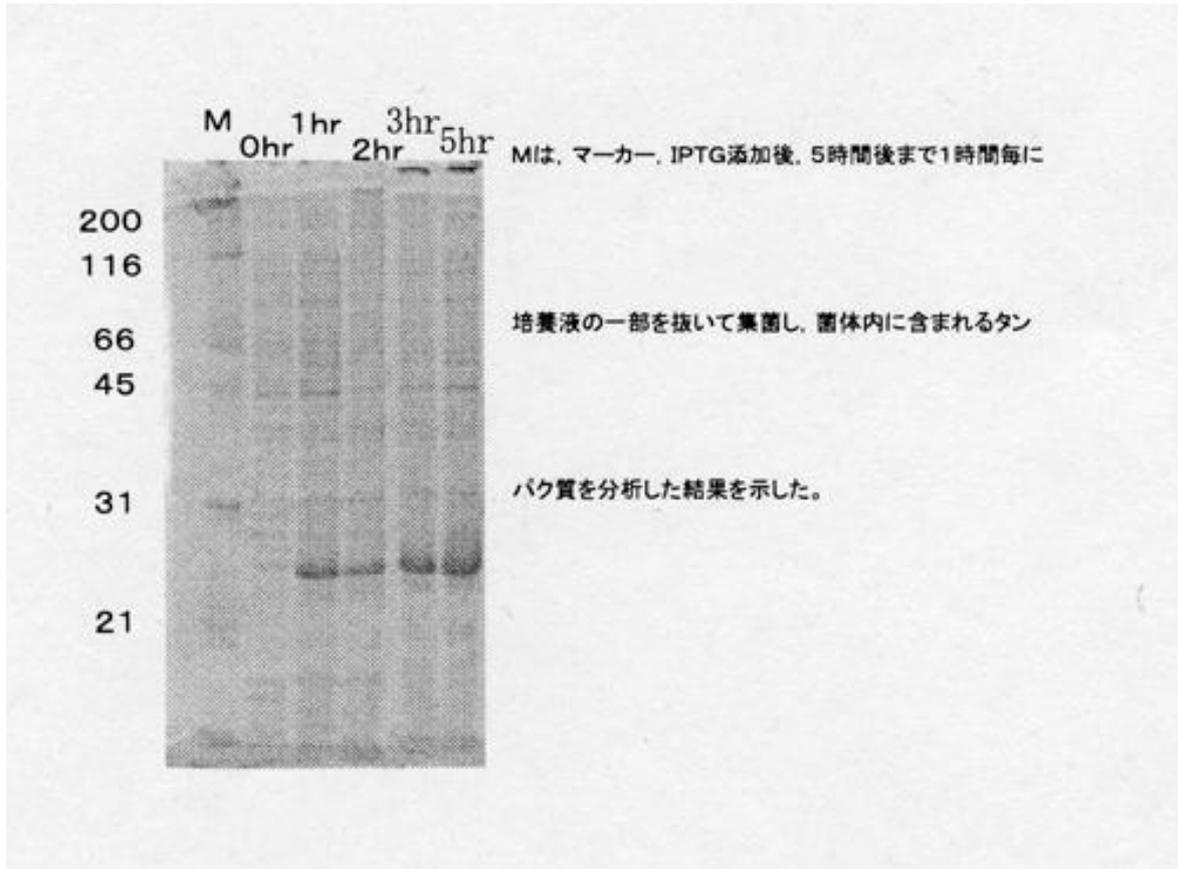
<400>

```
atgtttcaga ettttatctc tcgccataat tcaaactttt tttctgataa getggttctc 60
acttctgtta ctccagcttc ttccgacact gttttacaga cacctaaagc tacatcgta 120
acgttatatt ttgatagttt gacggtaat gctggtaatg gtggttttct tcattgcatt 180
cagatggata catctgtcaa cgccgctaata caggttggtt ctggttggtc tgatattgct 240
tttgatgccg accctaaatt ttttgctgt ttggttcgct ttgagtcttc ttcggttcg 300
actaccctcc cgactgccta tgatgtttat ctttgaatg gtcgccatga tgggtgttat 360
tataccgtca aggactgtgt gactattgac gtccttcccc gtaccgccc caataacgtt 420
tatgttggtt tcatggtttg gtctaacttt accgtaacta aatgccgcgg attggtttcg 480
ctgaatcagg ttattaaaga gattatttgt ctccagccac ttaagggatc cagatctcat 540
caccatcacc atcaactaa 558
```

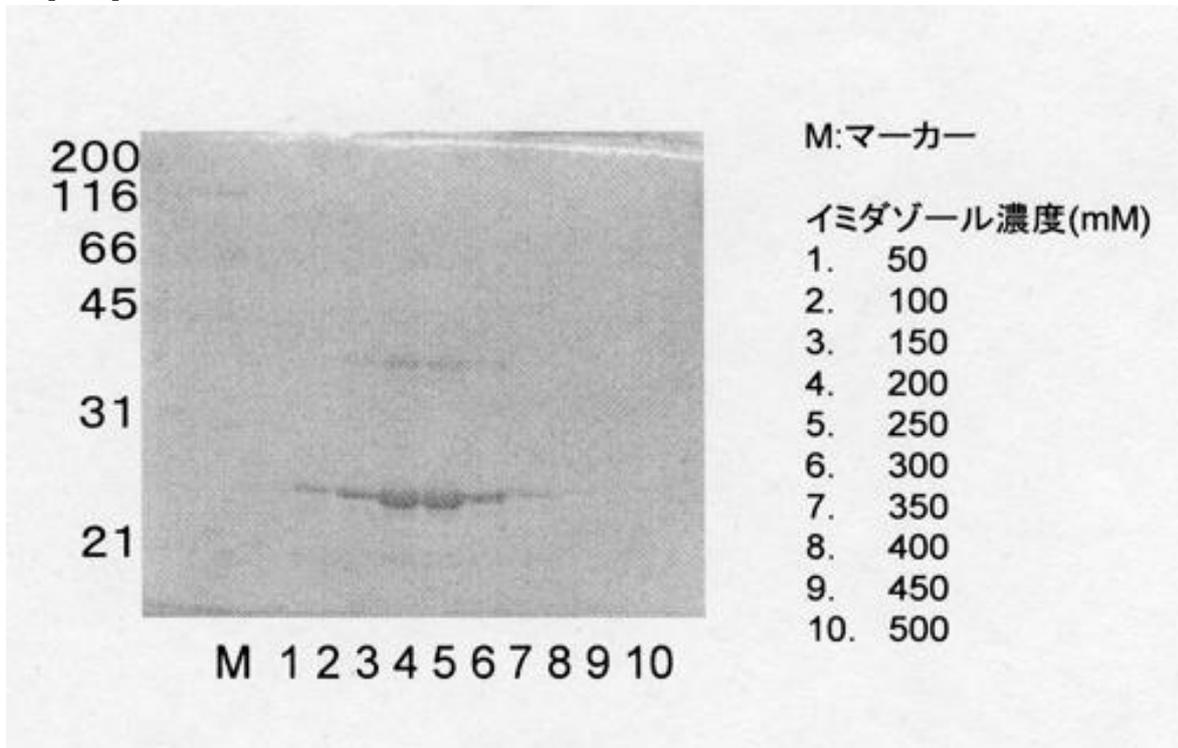
【書類名】 図面
【図 1】



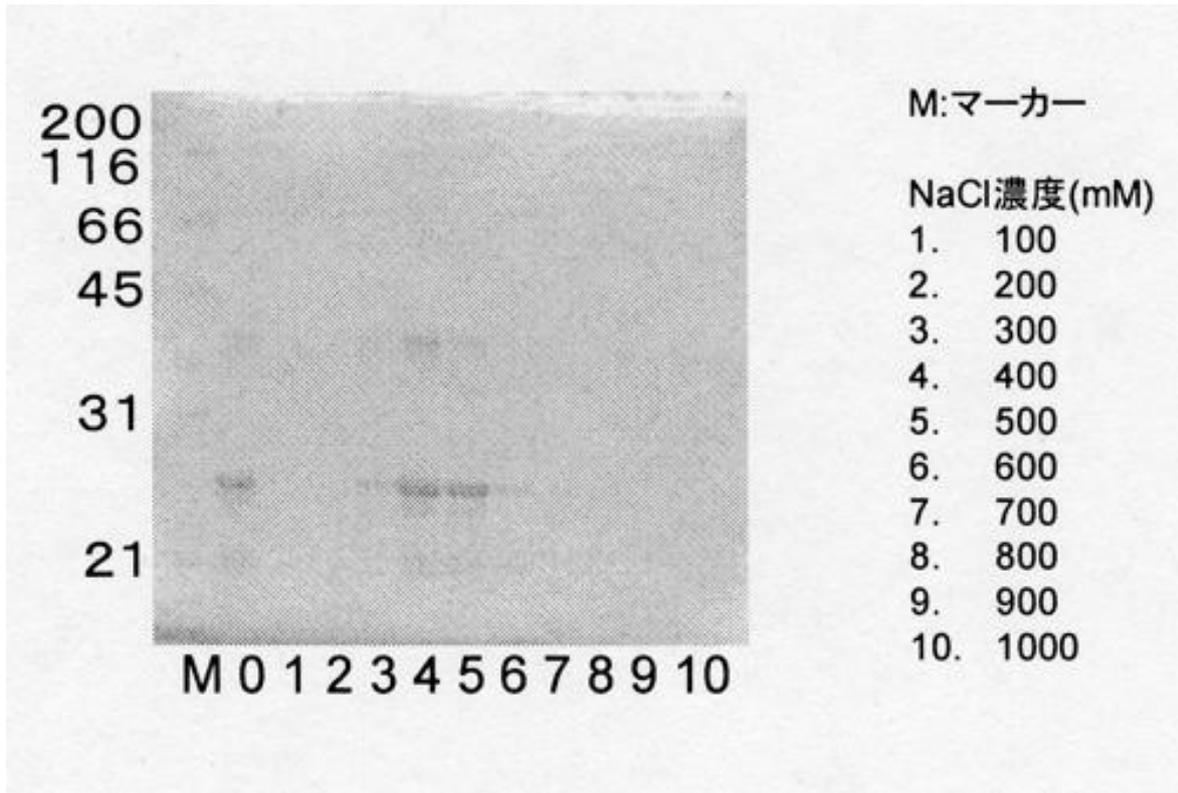
【図2】



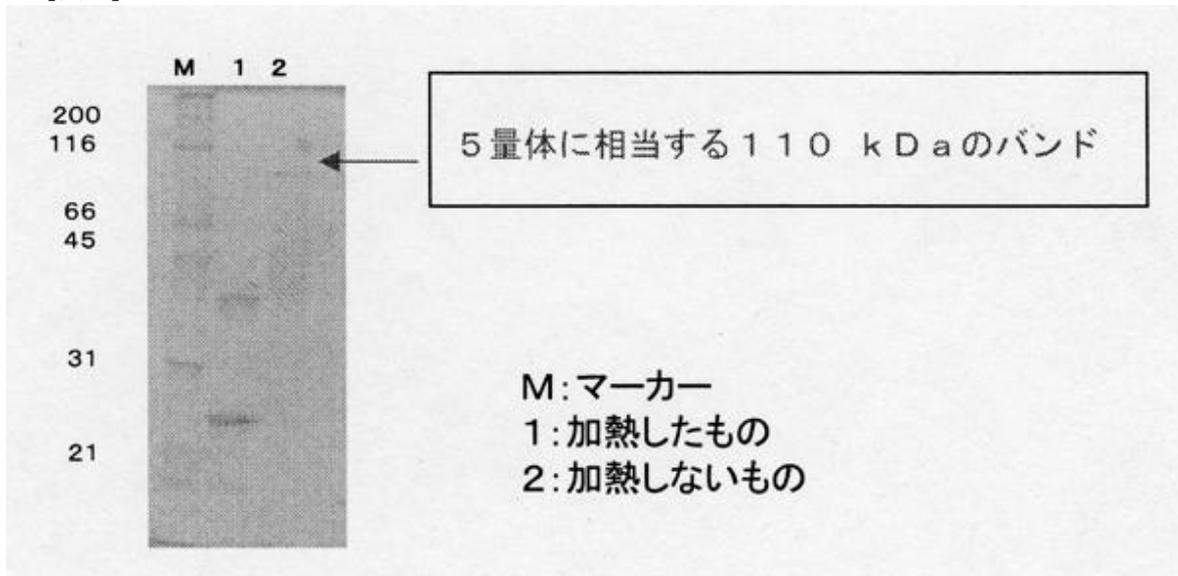
【図3】



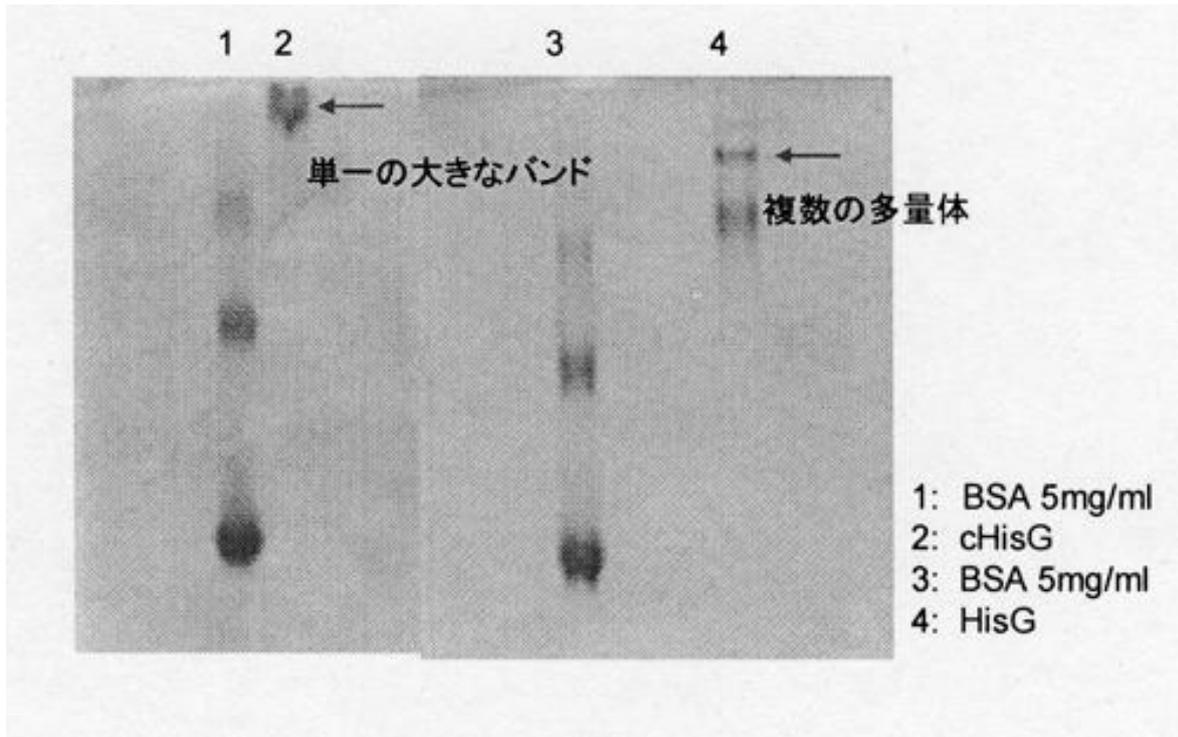
【図4】



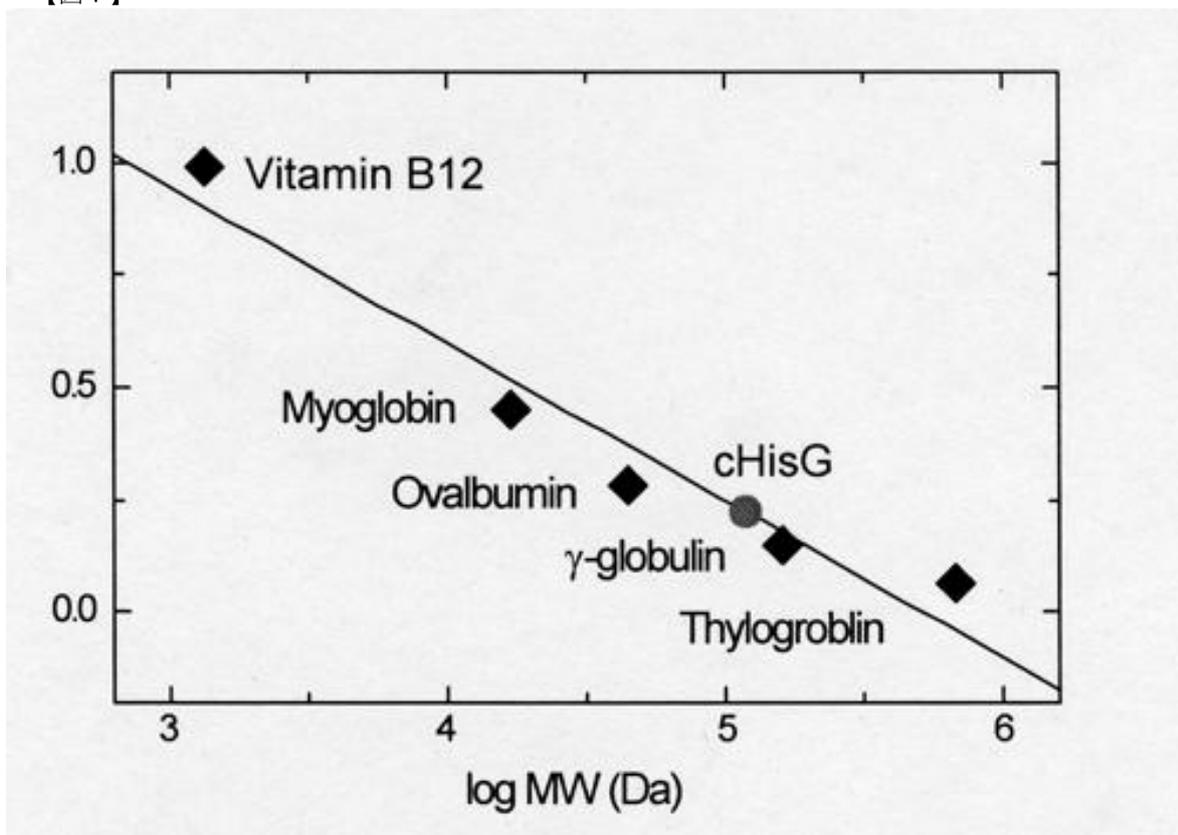
【図5】



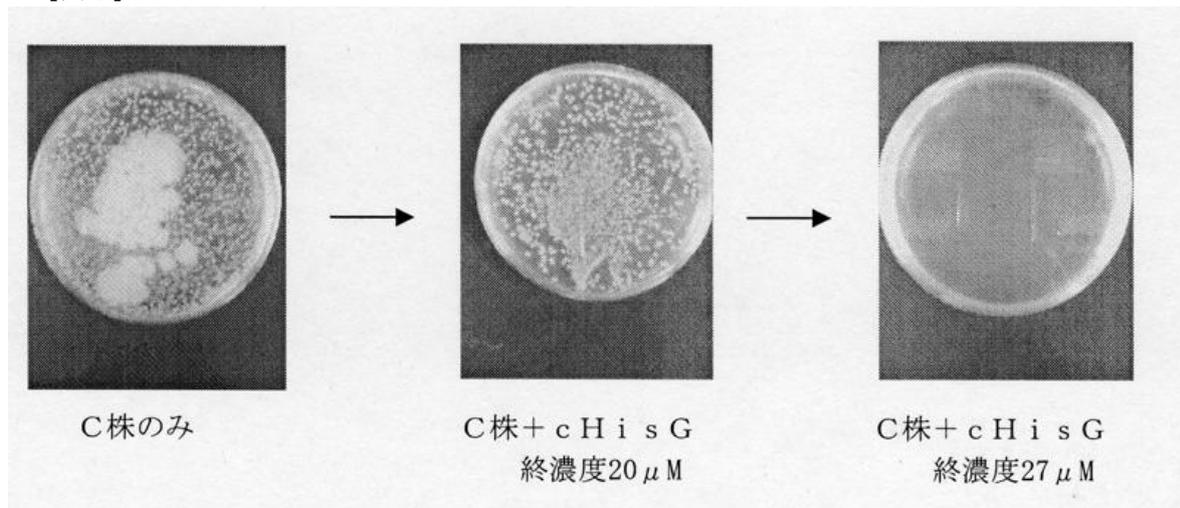
【図6】



【図7】



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来、多種の大腸菌が存在するものなかから、特異的に、大腸菌C株の増殖をコントロールしたり、さらには大腸菌C株の検出をすることができなかった。

【解決手段】 新規な物質である、バクテリオファージφ X 1 7 4由来の5量体スパイクGタンパク質を大腸菌C株の増殖をコントロールしたり、さらには大腸菌C株の検出に用いる。

【選択図】 図8