

C. thermocellum CelC と比べて少なかった。以上のことから CBM30-Ig-CD9 は典型的なエンドグルカナーゼとは異なるものと考えられた。CBM を欠いた Ig-CD9, CD9 の酵素活性を測定した結果、わずかな活性しか示さなかった。この結果 CelJ のファミリー9 触媒ドメインにおいても CelQ と同様 CBM が酵素活性に不可欠であることが分かった。

CBM30 の不溶性多糖, 可溶性多糖に対する親和性を調べた。CBM30 は, 不溶性セルロース, 可溶性セルロース共に親和性を示した。この他, リケナン, バーレイb-グルカンに対して親和性を示したが, キシラン, キチン, アガロースに対しては親和性を示さなかった。CBM30 の可溶性オリゴ糖に対する結合特性を VP-ITC titration

calorimeter を使用し定量的に解析した。CBM30 は, セロペンタオース, セロヘキサオースに親和性を示し, それぞれのオリゴ糖に対する結合定数は, 2.3×10^4 , 8.2×10^4 であった。CBM30 は, 不溶性や可溶性セルロース, b-1,3,-1,4 結合から構成されるリケナンや大麦グルカンなど幅広い基質に親和性を示した。これは, 隣接するファミリー9 触媒ドメインの基質特異性と一致しており, CBM30 の存在は, 触媒ドメインの活性を強めていると考えられた。

以上の研究によってファミリー9 触媒ドメインの触媒作用に, CBM が不可欠であることが明らかになった。また, ファミリー30CBM の詳細な機能を明らかにした。

生物機能応用科学専攻

氏名	川浦 知子
学位記番号	生博 甲第 139 号
学位記授与の日付け	平成 15 年 3 月 25 日
学位論文題目	バクテリオファージ ϕ X174 スパイクタンパク質 G による LPS 認識機構に関する研究
論文審査委員	主査 教授・西川 司朗 教授・古市 幸生 教授・田中 晶善 助教授・稲垣 穰 講師・苅田 修一

要 旨

小さな正 20 面体ウイルスであるバクテリオファージ ϕ X174 は, 一本鎖環状 DNA と F, G, H, J の 4 種類のタンパク質から構成される, 最も単純なファージの一つである。正 20 面体の各頂点に存在する 5 つの G タンパク質と 1 つの H タンパク質で構成されるスパイクと呼ばれる突起を持っている。 ϕ X174 は大腸菌 C 株などの腸内細菌科のラフ型株のうち, 菌体を覆うリポ多糖 (LPS) が完全な R-コア糖鎖を持つ Ra 株を宿主としており, 感染の際には前述のスパイク部分で細胞表面の LPS をレセプターとして認識し, それがスイッチとなってカプシドの変形を起こし, DNA を放出すると考えられている。本研究では, ϕ X174 の宿主認識における G タンパク質の機能とレセプター側の LPS の構造的な要請について, さまざまな検討を行った。得られた結果を

総合的に考察することにより, タンパク質による糖鎖並びに糖脂質認識の一機構が分子レベルで解明を進めた。

まず, G タンパク質の LPS 結合能について検討した。G タンパク質の N 末端にヒスチジンタグを持つ融合タンパク質 (HisG) を調製し, 2 段階のクロマトグラフィーにより電気泳動上で単一のバンドを示すタンパク質を得た。この HisG とファージ宿主菌株あるいは非宿主菌株由来の LPS との結合能を, 酵素リンク法および蛍光滴定法を用いて確認したところ, HisG は, 宿主菌株 LPS と特異的に結合することが明らかになった。

次に, LPS 構造中のどの部分が HisG の認識に重要かを調べるため, 親水性の R-コア糖鎖の長さが異なる各種の LPS, および大腸菌 C 株 LPS を部分分解して疎水性の脂肪酸鎖を除去した脱アシル誘導体を用いて, LPS の部分構造に対する要請を検討した。HisG の蛍光

スペクトルが LPS やその誘導体と結合することにより濃度依存的に蛍光強度が減少することを利用して、解離定数 K_d を算出した。また、円偏光二色性 (CD) スペクトルの変化を観測することにより、LPS やその誘導体との結合における HisG の立体構造変化を調べた。その結果、疎水的な脂肪酸鎖を欠く脱アシル誘導体では、HisG との親和性は低下するものの、立体構造変化は LPS そのものと同様の傾向が見られた。その一方で、R-コア糖鎖を一部欠く ϕ X174 非宿主菌株由来の LPS では、HisG とある程度強い親和性を示したが、結合時の立体構造変化は小さくなった。これらのことから、HisG が LPS と強い結合を起こすためには、LPS の部分構造のうち、親水-疎水性部分の両方を必要とするが、フェージ感染に至る好ましい立体構造変化を起こすためには完全な R-コア糖鎖の存在が不可欠であることが判明した。

ここで視点を変えて、HisG のアミノ酸配列において、LPS の持つリン酸残基や KDO の持つ負荷電と相互作用すると思われるリジンおよびアルギニン残基を標的にした化学修飾を行ったところ、LPS との結合力が大きく減少したことから、これらのアミノ酸残基が結合に寄与していることが明らかになった。そこで、タンパク質表面に位置する Lys86, Arg134, Lys154 をそれぞれ Ala に置換した変異体 K86A, R134A, K154A を調製して、

LPS との結合能を検討した。他の変異体は野生株と大きな差は見られなかったが、K86A は LPS との結合による立体構造変化が著しく低下した。ウイルス粒子上の G タンパク質は、8本の逆平行 β -バレル構造をとっているが、Lys86 が 2つの β -シート間を繋ぐループ構造の近傍に位置しており、比較的自由に動く事が想定されることから、LPS との相互作用に極めて重要な残基の一つであると考えられた。しかし、複数の正荷電残基を化学修飾した場合には、結合力・立体構造変化の両方が低下した事から、LPS との結合には Lys86 以外の残基も寄与することが示唆された。

以上、本研究では、タンパク質による LPS の認識の一機構に関して、脂肪酸鎖は LPS を膜に固定するアンカーの機能だけでなく、タンパク質との結合を強める積極的な機能があることを証明できた。これは、G タンパク質が糖脂質に結合して更に構造を変える二段の認識を行うことを意味し、糖と脂質の相乗作用を明確に示した数少ない成果である。生命活動の重要な局面に関わるタンパク質-糖脂質の分子認識を解明することは、情報伝達の特異的阻害剤などのさまざまな応用技術の基礎となる筈である。本研究がそのような場面での有益な基盤情報となることを期待する。