

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770164

研究課題名（和文）病原菌の新規「タイプ6分泌装置」蛋白質群にみられる収縮性ファージと共通の立体構造

研究課題名（英文）Structural analysis of novel type 6 secretion apparatus proteins

研究代表者

金丸 周司（KANAMARU SHUJI）

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：50376951

研究成果の概要（和文）：結晶構造解析をめざし、大腸菌 O157 ならびに大腸菌 CFT073 のタイプ6分泌装置構成蛋白質 VgrG 蛋白質 6 種の全長蛋白質ならびに C 末端ドメインに関して、蛋白質の大量発現系を構築した。そのうち、大腸菌 O157 の VgrG1 において、精製法を確立し、安定なドメインを得るため種々のプロテアーゼ消化を行い、トリプシンにより VgrG1^{M467-his}を得た。さらに、この VgrG1^{M467-his} において結晶化に成功し良好な回折データを得ることができた。現在、同系置換体を作成し位相決定をめざしている。また、それ以外の VgrG 発現系においても発現条件、精製法を確立しつつある。

研究成果の概要（英文）：To determine the crystal structure of VgrG protein of Type 6 secretion apparatus from *E. coli* O157 and *E. coli* CFT073, over-expression vectors for both full-length and C-terminal domain of VgrG were constructed. We succeeded in establish the purification methods for VgrG from *E. coli* O157. Purified protein was treated with trypsin to get stable VgrG1^{M467-his}. This VgrG1^{M467-his} was examined thousands of crystallization condition. One of the conditions gave nice crystal formation for structure determination. Now we are trying get isomorphous heavy atom derivatives for phase determination. Moreover, we are going to establish other VgrG purification strategy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：グラム陰性菌・分泌装置・バクテリオファージ・構造解析・T6SS・ヘリックス・VgrG

1. 研究開始当初の背景

本研究の対象となる、最近新たに報告されたタイプ6分泌装置(T6SS)については、その分泌装置の構造・分泌メカニズムや輸送される基質タンパクについてほとんど知見がなかつた。また、このタイプ6分泌装置(T6SS)の構成蛋白質に毒素を運ぶキャリアー蛋白質(VgrG)が存在し、T4ファージ gp5-gp27複合体と類似の構造をもつのではないかと報告がなされた。更に、T6SS 遺伝子

った。また、このタイプ6分泌装置(T6SS)の構成蛋白質に毒素を運ぶキャリアー蛋白質(VgrG)が存在し、T4ファージ gp5-gp27複合体と類似の構造をもつのではないかと報告がなされた。更に、T6SS 遺伝子

クラスターに収縮性ファージ構成蛋白質と類似の遺伝子があることも分かってきた。このように、一部収縮性ファージと類似の蛋白質群で構成される T6SS ならびに VgrG 蛋白質の構造と機能に興味を持ち、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、病原性大腸菌のタイプ 6 分泌装置(T6SS)の構成蛋白質のうち、ファージ尾部構成蛋白質と配列あるいは構造類似の蛋白質群の大量発現系の構築・精製、性状解析、構造解析を行いタイプ 6 分泌装置の構造と機能を明らかにすることを目的としている。特にその中でも T4 ファージ(gp5)₃(gp27)₃ 注射針複合体と類似の構造を持つと予想される VgrG 蛋白質を中心に研究を進める。

3. 研究の方法

(1)VgrG 蛋白質の発現・精製:

大腸菌 0157 ならびに大腸菌 CFT073-VgrG 蛋白質 (VgrG1, 2, 3) の大量発現系をそれぞれの大腸菌より対応する遺伝子を PCR 法により増幅し確立する。

発現した VgrG 蛋白質の精製法を確立する。具体的には、当研究室にすでにあるカラムクロマト装置 (AKTA explorer 10S) を用いて、金属アフィニティー、イオン交換、ゲルろ過等の各種クロマトグラムにより精製を行う。

(2)生化学的・物理化学的解析:

精製した VgrG 蛋白質の溶液中での二次構造、会合状態、分子の大まかな形状等を円偏光二色性(CD)や超遠心分析、多角度光散乱等(全て当研究室内設備)を用いて解析を行い、結晶化に適した分子種が得られているか確認する。

(3) 結晶化:

その後、結晶化に適した精製試料を用いて結晶化を試みる。具体的には、市販のグローバルな結晶化条件スクリーニングキット (Hampton Research 社、Molecular Dimension 社、EmeraldBiostructures 社など)を用いて、蒸気拡散法により結晶化条件の初期検索を行う。

(4) 立体構造解析:

得られた良質な結晶を X 線発生装置(学内共同利用設備)ならびに大型放射光施設 (PF, Spring-8) を利用して、X 線結晶回折データの収集を行う。良好な回折データが得られたものにつき、まず初めに T4 ファージ(gp5)₃(gp27)₃ 複合体の構造情報を利用し分子置換法による位相の決定を試みる。位相が得られない場合には、重原子同型置換法、または多波長異常分散法等を用いて位相を決定し、構造解析を行う。

4. 研究成果

(1) 大腸菌 0-157 と大腸菌 CFT073 の全長 VgrG 蛋白質の発現と結晶化スクリーニング: 大腸菌 0-157 の 3 つの VgrG 蛋白質と大腸菌 CFT073 の 3 つの VgrG 蛋白質を大腸菌で発現させたところ、大腸菌 0-157 の VgrG1 と大腸菌 CFT073 の c3393 についてのみ可溶性に得ることができた。c3393 は収率が低く結晶化スクリーニングを行えなかったため、VgrG1 について結晶化スクリーニングを行ったが結晶を得ることはできなかった。

(2)N 末端欠失 VgrG 蛋白質の性状解析:

大腸菌 0-157 の VgrG1 と大腸菌 CFT073 の c3393 について OBfold と構造未知の部分あるいは構造未知の部分のみの 2 通りの長さの N 末端欠失変異体を作成した。大腸菌 BL21(DE3)で発現したところ VgrG1^{467M-Cterm-his}のみ可溶性画分に得ることができた。

VgrG1^{467M-Cterm-his} の精製は Ni アフィニティークロマトグラフィー・陰イオン交換クロマトグラフィー・ゲル濾過クロマトグラフィーにより行った。

VgrG1^{467M-Cterm-his} の超遠心分析(沈降速度法)を行ったところ全長と同じく 3 量体を形成していることが分かった。次に円二色性(CD)スペクトルを測定したところ 構造と共に構造を持たない領域が多く含まれることが示唆された。そこでトリプシンによる限定加水分解を試みたところ Gly 561 から C 末端のフラグメント (VgrG1^{561G-Cterm-his}) が得られた。従って N 末端側がフォールドしていなかったと考えられる。標品によっては消化されない分子種も見られたため、沈降速度法で均一に見える精製標品中に N 末端側が正しくフォールドした分子種が存在することが分かった。VgrG1^{561G-Cterm-his} について超遠心分析(沈降平衡法)を行ったところ分子量は 24.4kDa と推定され、VgrG1^{561G-Cterm-his} (8.6kDa) は 3 量体であることが分かった。また、円二色性スペクトルを測定したところ シート構造に特徴的な 216nm の谷が見られたため、三本鎖ヘリックス構造を保持していると思われる。

(3) SlyD 融合 VgrG1363L-Cterm の発現・精製:

不溶性蛋白質の可溶化能を持つ SlyD 蛋白質を N 末端に融合させた HisSlyD-VgrG1^{363L-Cterm} を C 末端 His タグの有無の 2 通りで作成し、発現させたところ大部分を可溶性画分に得られたため、N 末端欠失 VgrG 蛋白質と同様の方法で精製した。C 末端 His タグ有無のゲル濾過クロマトグラムを比較すると (3 量体)n と思われるピークは両方で見られる一方、3 量体と思われるピークは C 末端 His タグ有のみ見られることから C 末端に His タグが存在すると 2 つの分子種が共精製される可能性が示唆された。

(4) トリプシン切断 VgrG1^{467M-Cterm-his} の結晶化・X線回折データ収集:

VgrG1^{467M-Cterm-his} につき、約 1300 条件の結晶化条件を試みたところ、ただ 1 つの条件でのみで結晶が得られた。結晶化条件の最適化を行ったところ約 0.1mm のサイズの結晶が得られた。放射光施設(SLS)にて、分解能が約 2.5 のフルセットの X 線回折データを収集できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

- (1) Akita, F., Higashiura, A., Shimizu, T., Pu, Y., Suzuki, M., Uehara-Ichiki, T., Sasaya, T., Kanamaru, S., Arisaka, F., Tsukihara, T., Nakagawa, A. & Omura, T. (2012). Crystallographic analysis reveals octamerization of viroplasm matrix protein P9-1 of Rice black streaked dwarf virus. *J Virol* 86, 746-56. (査読有)
- (2) Yokoi, N., Miura, Y., Huang, C. Y., Takatani, N., Inaba, H., Koshiyama, T., Kanamaru, S., Arisaka, F., Watanabe, Y., Kitagawa, S. & Ueno, T. (2011). Dual modification of a triple-stranded beta-helix nanotube with Ru and Re metal complexes to promote photocatalytic reduction of CO₂. *Chem Commun (Camb)* 47, 2074-6. (査読有)
- (3) Nishima, W., Kanamaru, S., Arisaka, F. & Kitao, A. (2011). Screw motion regulates multiple functions of T4 phage protein gene product 5 during cell puncturing. *J Am Chem Soc* 133, 13571-6. (査読有)
- (4) コンポジション・グラジエント法を用いた多角度光散乱装置による分子間相互作用解析 金丸 周司. *生物工学会誌* 89, 378-380 (2011). (査読無)
- (5) Yokoi, N., Inaba, H., Terauchi, M., Stieg, A. Z., Sanghamitra, N. J., Koshiyama, T., Yutani, K., Kanamaru, S., Arisaka, F., Hikage, T., Suzuki, A., Yamane, T., Gimzewski, J. K., Watanabe, Y., Kitagawa, S. & Ueno, T. (2010). Construction of robust bio-nanotubes using the controlled self-assembly of component proteins of bacteriophage T4. *Small* 6, 1873-9. (査読有)
- (6) Yap, M. L., Mio, K., Leiman, P. G., Kanamaru, S. & Arisaka, F. (2010). The

baseplate wedges of bacteriophage T4 spontaneously assemble into hubless baseplate-like structure in vitro. *J Mol Biol* 395, 349-60. (査読有)

- (7) Yap, M. L., Mio, K., Ali, S., Minton, A., Kanamaru, S. & Arisaka, F. (2010). Sequential assembly of the wedge of the baseplate of phage T4 in the presence and absence of gp11 as monitored by analytical ultra-centrifugation. *Macromol Biosci* 10, 808-13. (査読有)
- (8) Nakata, Y., Fukae, T., Kanamori, R., Kanamaru, S. & Matsuda, T. (2010). Purification and characterization of acetophenone reductase with excellent enantioselectivity from *Geotrichum candidum* NBRC 4597. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 625-31. (査読有)
- (9) Leiman, P. G., Arisaka, F., van Raaij, M. J., Kostyuchenko, V. A., Aksyuk, A. A., Kanamaru, S. & Rossmann, M. G. (2010). Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Virology* 7, 355. (査読有)
- (10) Danev, R., Kanamaru, S., Marko, M. & Nagayama, K. (2010). Zernike phase contrast cryo-electron tomography. *J Struct Biol* 171, 174-81. (査読有)
- (11) Koshiyama, T., Ueno, T., Kanamaru, S., Arisaka, F. & Watanabe, Y. (2009). Construction of an energy transfer system in the bio-nanocup space by heteromeric assembly of gp27 and gp5 proteins isolated from bacteriophage T4. *Org Biomol Chem* 7, 2649-54. (査読有)
- (12) Kanamaru, S. (2009). Structural similarity of tailed phages and pathogenic bacterial secretion systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4067-8. (査読有)

[学会発表](計 27 件)

- (1) T4 ファージ Spackle 蛋白質による gp5 テイルリゾチームの溶菌阻害メカニズム. 内田 一也、金丸 周司、有坂 文雄: (第 10 回 微生物研究会)2011.11.12(千葉大学松戸キャンパス).
- (2) Crystal structure reveals how spackle protein (gp61.3) inhibits lysozyme activity of gp5 tail lysozyme from bacteriophage T4. Shuji Kanamaru: (XXII Ind Biennial Conference on Phage/Virus Assembly) 2011.10.9 - 2011.10.14 (The Marine Sciences

- Institute.)
- (3) T4 ファージのアンチホーリンによるホーリンの凝集抑制と溶菌阻止メカニズム.伊藤 悠太、金丸周司、有坂 文雄:(第84回日本生化学会大会)2011.9.20-2011.9.24(国立京都国際会館)
 - (4) T4 ファージ gp7C 末端フラグメントの基盤ウェッジ形成における役割.伊藤 豪、金丸周司、有坂 文雄:(第49回日本生物物理学学会年会)2011.9.15-2011.9.18(兵庫県立大学・姫路書写キャンパス).
 - (5) Protein-protein interaction analysis by composition gradient multiangle light scattering(CG-MALS).金丸周司:第11回蛋白質科学会年会2011.6.6-2011.6.9(ホテル阪急エキスポパーク)
 - (6) コンポジション・グラジエント法を用いた多角度光散乱装置による分子間相互作用解析.金丸周司(第1回生体分子相互作用解析ワークショップ)2011.3.10(東京)
 - (7) Identification of the protein components in the baseplate hub assembly of bacteriophage T4.金丸周司、愛木健人、有坂文雄(第83回日本生化学会年会)2010.12.9(神戸)
 - (8) Expression and characterization of the baseplate wedge proteins gp53 and gp25 of bacteriophage T4.門崎泰憲、金丸周司、有坂文雄(第83回日本生化学会年会)2010.12.8(神戸)
 - (9) 超遠心分析による T4 ファージ尾部基盤ウェッジの逐次的分子集合機構の解明.Moh Lan Yap、三尾和弘、金丸周司、有坂文雄:(日本生物物理学学会第47回年会)2010.9.21(仙台)
 - (10)人工三本鎖 ヘリックス蛋白質の設計・発現と会合の制御.金丸周司、油井孔兵、有坂文雄:(第10回日本蛋白質科学会年会)2010.6.17(札幌)
 - (11)大腸菌 0-157 と大腸菌 CFT073 のタイプ 6 分泌系の VgrG 蛋白質の性状解析.内田一也、金丸周司、有坂文雄:(第10回日本蛋白質科学会年会)2010.6.17(札幌)
 - (12) In vitro-assembled wedges of phage T4 spontaneously associate to form hub-less baseplate-like structure. Yap Moh Lan・三尾和弘・Petr G.Leiman・門崎泰憲・金丸周司・有坂文雄(特定領域研究「生体超分子構造」第6回シンポジウム)2009.12.1(大阪)
 - (13)大腸菌タイプ 6 分泌系の VgrG タンパク質の可溶向上の試み.内田一也・金丸周司・有坂文雄(特定領域研究「生体超分子構造」第6回シンポジウム)2009.12.1(大阪)
 - (14) T4 ファージ尾部ウェッジ複合体形成反応測定のための変異体 gp11 の作製.竹口誠也・金丸周司・有坂文雄(特定領域研究「生体超分子構造」第6回シンポジウム)2009.12.1(大阪)
 - (15) T4 ファージ gp34N 末端決失変異体の大量発現系の作製と性情解析.名村実公賢・金丸周司・有坂文雄(特定領域研究「生体超分子構造」第6回シンポジウム)2009.12.1(大阪)
 - (16)人工三本鎖 ヘリックス蛋白質の改変.油井孔兵・寺内允・金丸周司・有坂文雄(特定領域研究「生体超分子構造」第6回シンポジウム)2009.12.1(大阪)
 - (17) Baseplate Wedge Assembly of Bacteriophage T4 in vitro.Yap Moh Lan・金丸周司・有坂文雄(日本生物物理学学会第47回年会)2009.10.29(淡路島)
 - (18)人工三本鎖 ヘリックス蛋白質の効率的生産と会合抑制.油井孔兵・寺内允・金丸周司・有坂文雄(日本生化学会年会)2009.10.24(神戸)
 - (19) Spackle Protein and Tail Lysozyme (gp5) of Bacteriophage T4.Shuji Kanamaru, Mai Nemoto, Mako Okuda and Fumio Arisaka(The 21st Biannual Phage /Virus Assembly Meeting) 2009.9.25(フランス・アヌシー)
 - (20) In vitro Assembled Wedge of Phage T4 Spontaneously Formed Baseplate-like Structure.Moh Lan Yap, Yasunori Monzaki, Kazuhiro Mio, Petr Leiman, Shuji Kanamaru, and Fumio Arisaka.(The 21st Biannual Phage /Virus Assembly Meeting)2009.9.25(フランス・アヌシー)
 - (21) In vitro-Assembled Wedges of Phage T4 Form a Star-shaped Baseplate.Moh Lan Yap, Yasunori Monzaki, Kazuhiro Mio, Petr G Leiman, Shuji Kanamaru, and Fumio Arisaka(特定領域研究「第5回ワークショップ」)2009.7.27(湘南国際村)
 - (22)人工三本鎖 -ヘリックス蛋白質の会合抑制.油井孔兵・寺内允・金丸周司・有坂文雄(特定領域研究「第5回ワークショップ」)2009.7.27(湘南国際村)
 - (23) T4 ファージ溶菌阻止関連蛋白質 gp61.3 の結晶化.奥田真子・根本舞・金丸周司・有坂文雄(特定領域研究「第5回ワークショップ」)2009.7.27(湘南国際村)
 - (24)大腸菌 0-157 のタイプ 6 分泌系の VgrG タンパク質の性状解析.内田一也・金丸周司・有坂文雄(特定領域研究「第5回ワークショップ」)2009.7.27(湘南国際村)

- (25) The baseplate wedge assembly pathway of phage T4 in vitro. Yap Moh Lan・中尾朋子・長尾達也・門崎泰憲・三尾和弘・金丸周司・有坂文雄(第9回蛋白質科学会年会)2009.5.21(熊本)
- (26) 人工3本鎖 α -Helix 蛋白質の効率的生産と会合抑制. 油井孔兵・寺内允・金丸周司・有坂文雄(第9回蛋白質科学会年会)2009.5.21(熊本)
- (27) T4ファージの溶菌阻止に関する Sp 蛋白質の構造と機能. 根本舞・金丸周司・有坂文雄(第9回蛋白質科学会年会)2009.5.21(熊本)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金丸 周司 (KANAMARU SHUJI)
東京工業大学・生命理工学研究科・助教
研究者番号：50376951

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：