

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570211

研究課題名(和文)ファージによる宿主認識機構の検証

研究課題名(英文) Inspection of mechanism for recognition of host by phage

## 研究代表者

米崎 哲朗 (Yonesaki, Tetsuro)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90115965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：K12株のLPS合成に関わる種々遺伝子の変異体を用いて様々なLPS構造とT4吸着能との関係およびOmpC依存性の有無を系統的に調べた。さらに、OmpCに依存しないB株には吸着できるがOmpCに依存するK12株には吸着できない、あるいはその逆の性質を示すT4ファージ変異体の単離に成功したことから、T4はOmpCに依存した吸着とOmpCに依存しない吸着という異なる機構を駆使することが明らかとなった。また、本研究からT4が認識するOmpCの構造、その認識に必要なT4尾部繊維先端部位のアミノ酸、について初めて具体的な情報が得られた。

研究成果の概要(英文)：T4 adsorption to *E. coli* K12 strain depends on the presence of OmpC, but T4 can adsorb to B strain independently of OmpC. Using K12 mutants defective in various genes required for LPS synthesis, we systematically analyzed the adsorption of T4 phage to these mutants dependent on or independent of OmpC. Furthermore, we isolated T4 mutants which can adsorb to B strain but not to K12 strain or vice versa. These results strongly suggest that T4 has two different mechanisms for adsorption to host cells. In addition, present study identified specific structures in OmpC and the distal tip of T4 long tail fiber, required for the recognition of OmpC by T4.

研究分野：分子生物学

キーワード：T4ファージ 大腸菌 OmpC LPS 吸着 尾部繊維先端部位

### 1. 研究開始当初の背景

感染症対策に有効であった抗生物質が、耐性菌の出現により効力を失いつつあるため、病原菌に感染するウィルス(ファージ)を利用することによって感染症を治療する、すなわちファージ療法に期待が寄せられるようになった。しかし、ファージ療法の実施にあたっては対象となる細菌に感染可能なファージを自然界から単離するという作業から始めなければならない。

ファージは長尾線維の先端(DT)が細菌の細胞表面にあるリセプター分子(LPSや膜蛋白)との弱い相互作用により可逆的に結合する。6本の長尾線維のうち3本以上がリセプターと結合すると、尾部基盤の構造変化が誘導され、短尾線維が露出することによってLPSに結合する。続いて尾部の構造変化が誘導されることによって頭部に収納されていたDNAが尾部管を通して細菌に注入される。細菌とファージの攻防は30億年前から始まっており、細菌はファージ感染を免れるためにリセプター分子の変異や修飾などによる変化を重ねてきた。一方、DTも変化したリセプター分子に親和性をもつように変異を重ねてきたため、ファージの感染可能な宿主域は極めて狭くなり、その結果高い宿主特異性を示すようになった。したがって、ある種の細菌に感染するファージが得られたとしてもその感染域は一部の亜種に限られるのが一般的である。このことは、同じ種の細菌が原因となる感染症であっても流行している亜種が異なればその度に感染可能なファージの単離が必要となる。そのため、ファージ療法は、感染症の流行時に原因菌を特定し、それに感染可能なファージを自然界から単離するという手順を踏むことになる。かりに、単離に成功したとしても治療薬として人体投与の場合には副作用の有無など安全性が問われることになるため治療開始までに多大な労力と時間を費やすことになる。このような事情からファージ療法の有効性や普及が疑問視されている。

T4ファージは増殖能が極めて高く、感染開始から溶菌までのプロセスが克明に解明されつつある唯一のファージといえる。T4は大腸菌の亜種に相当するK12株やB株には感染できるが、O株には感染できない。また、同じ腸内細菌科に属する近縁種の中では*Shigella*の一部の株に感染可能であるが、他の株や種の異なる*Salmonella*などには感染できない。しかし、宿主でない細菌についてもトランスフェクションによりファージDNAを菌体内に導入すれば*Salmonella*を始め*Aerobacter*, *Proteus*, *Serratia*, など多様な細菌内で増殖可能であることが報告されている(Wais and Goldberg, *Virology*, 39, 153-161, 1969)。したがって、T4ファージの宿主域を決定する仕組みを明らかにし、その知識をもとに宿主域を人工的に短時間で改変する技術を手に入れることができれば、可

能性が定かでないファージ単離作業や、単離したファージの安全性確認にかかる時間をスキップしてファージ療法に利用することが可能であると期待されている。

### 2. 研究の目的

宿主になり得るか否かは主としてファージDNAが菌体内に侵入できるか否かによって決められる。そして、ファージDNAの侵入には宿主へのファージ吸着能が決定的な役割を果たす。したがって、宿主域を決定する主要因は吸着であると考えられている。宿主域が異なるT4ファージファミリーの比較からT4ファージのDTは遺伝子37がコードする繊維状タンパク質gp37(1026アミノ酸)のC末端140アミノ酸に相当すると考えられている。しかし、DTのうち、どのアミノ酸がリセプターのどのような構造を認識するのかといった分子機構解明の第一歩に相当する知識も未だ得られていない。T4ファージの吸着機構に関する研究は50年前から開始したものの、現在でも詳細が不明なままであることの大きな要因は、DTとリセプターの相互作用様式にある。この相互作用は特異性が高いものの、可逆的であることが示すように両者の結合は弱く一過的である。したがって、安定な複合体を単離することができないため、物理化学的方法論を適用した解析が困難である。

本研究はT4DTとリセプターとの相互作用様式を解明するために、T4ファージの特性を利用した遺伝学的方法論を活用することによってDTとリセプターの相互作用に関わる分子構造の特定を目的とした。特異性が高いものの結合が弱い相互作用はファージの吸着に限らず、シグナル伝達や細胞間相互作用等に広く用いられていると思われるが、それらの解明のために有効な方法は得られていない。本研究は弱い相互作用の実態を明らかにするための突破口として位置付けられるものであり、T4ファージの宿主域改変技術開発の基礎的知見を提供すると共に他の弱い相互作用を研究するための基礎的知見も提供することができる。

### 3. 研究の方法

過去の研究からT4ファージがK12株に吸着する際のリセプターには外膜蛋白であるOmpCとLPSが共に必要であること、一方B株はOmpCが欠失しており、この株への吸着はLPSのみを必要とすることが報告されている。このことから両株への吸着様式は異なっている可能性がある。そこで、この可能性をさらに詳細に検討するため、K12株のLPS合成に関わる種々遺伝子の変異体を用いて様々なLPS構造とT4吸着能との関係およびOmpC依存性の有無を系統的に調べる。もし、異なる2種の機構が存在するならば、両機構でのLPS構造の要求性に違いが認められる可能性がある。

K12株とB株とでT4の吸着様式が異なる場合、K12株には吸着できるがB株には吸着できない、あるいはその逆となるT4ファージの変異体を単離し、それぞれの様式に関わるDT内アミノ酸を対応づけることが可能となると共に、2つの異なる吸着機構の存在が証明できる。

OmpCに依存した吸着様式をさらに解析するため、OmpCのアミノ酸配列を改変してT4の吸着能との関係を調べることから、T4の吸着に必須なアミノ酸を同定する。また、アミノ酸置換によりリセプター活性を失ったOmpCに吸着可能なT4ファージ変異体を単離することによりOmpC認識に必要なDT領域内アミノ酸の同定を行う。

#### 4. 研究成果

##### 様々なLPS構造をもつK12株変異体とOmpCに依存したT4吸着能

国立遺伝学研究所のK0コレクションからLPS outer core合成に関わる遺伝子のノックアウト株( $\Delta waaR$ ,  $\Delta waaQ$ ,  $\Delta waaB$ ,  $\Delta waaG$ )を入手した。K12株LPSのouter coreは6個の糖分子から成っているが、これらの変異株のLPS outer coreはそのうち3~6個の糖分子を欠いている。また、LPS inner coreも6個の糖分子から成っているが、K0コレクションから入手したノックアウト株( $\Delta waaF$ ,  $\Delta waaC$ )は、outer coreをもたない上、inner coreを構成する6分子の糖のうち2~3個を欠いている。それぞれの株に対するT4ファージの吸着を調べたところ、LPS outer coreの構造変化はT4吸着能に大きな影響を与えなかったが、inner coreの構造変化はT4の吸着能を著しく低下させた。このことから、OmpCに依存したT4の吸着にはLPSのouter coreは必須でないが、inner coreは必須であることが明らかとなった。Yamada and Mizushima (J. Bact., 135, 1024-1031, 1978)は、OmpCとLPSが共存するとリポタンパクが結合したペプチドグリカン層上にOmpCが規則正しく格子状に配置すること、この配置はSDSで処理した細胞外皮に見られる構造と良く似ていることを報告した。また、Furukawa等 (J. Bact., 140, 1071-1080, 1979)はこの条件下ではT4ファージの吸着反応(尾部の構造変換)が起きるためファージの不活化が起きることを報告している。これらの報告と今回我々が得た結果を総合すると、OmpCが規則正しい配置を保つにはLPS inner coreが不可欠であることを示唆している。

##### 様々なLPS構造をもつK12株変異体とOmpCに依存しないT4吸着能

上記のノックアウト株に $\Delta ompC$ を導入して、T4ファージの吸着を調べたところ、殆どの株に吸着できなかった。しかし、outer coreとしてGlucoseを1分子のみ有する株では効率良く吸着できた。したがって、OmpCに依存しない吸着ではLPS outer coreの特異的な構

造が必須であることがわかった。OmpCに依存しない吸着では、OmpCに代わる別のタンパク質がリセプターとして機能している可能性が考えられたので、石油エーテル/フェノールを用いて各株からLPSを抽出・精製してT4との相互作用を調べたところ、outer coreとしてGlucoseを1分子だけ有する場合のみT4ファージの不活化が認められた。このことはこのLPSがT4ファージのDTと直接相互作用した結果、尾部の構造変換が起きたことを示す。outer coreとしてGlucoseを1分子だけ有するLPSは、outer coreとしてGlucoseを2分子有するB株のLPSと構造が類似しており、末端に側鎖をもたないGlucoseを有する点で共通している。B株のLPSもT4ファージを不活化するので、T4ファージのDTとの相互作用が同じであると考えられる。

##### 2つの吸着機構のそれぞれに特異的なDT領域内アミノ酸の同定

上述のようにOmpCに依存した吸着とOmpCに依存しない吸着では要求するLPS構造条件に大きな差異が認められることから、T4の吸着には異なった2種の機構が存在することが強く示唆された。そこで、片方の機構は維持したまま、他方の機構が不全となるT4変異体の単離を試みた。まず、OmpCに依存しない機構のみを保持した変異体を得るために、T4ファージストックをK12株と混合した後、細胞を遠心操作により除去することで、吸着したファージを取り除いた。この操作により、B株に吸着できるが、K12株に吸着できないT4ファージクローンを濃縮できる。この操作を3回繰り返した後に、B株を指示菌としてシングルプラークを形成させてスクリーニングを行ったところ効率よく意図する変異体を得られた。3クローンの塩基配列を解析したところ、いずれもDT内の16アミノ酸からなる領域(gp37の940-955番目の領域)の異なる部位にアミノ酸置換が起きていた。興味深いことに、これらのクローンはLB中ではB株に効率よく吸着するものの、野生型ファージとは異なってリン酸緩衝液中のB株には吸着できないことがわかった。同様に、精製したB株LPSはLB中ではこれら変異体を不活化できるが、酸緩衝液中ではできなかった。原因については解析中であるが、LB中に含まれるアミノ酸や金属イオン等がこれら変異体の吸着補因子として必要であるらしい。したがって、gp37の940-955番目の領域内アミノ酸置換はOmpCに依存した吸着機能を欠損させると共にLPSとの相互作用にも影響を与えていることから、この領域はLPSとの相互作用にも重要だと考えられる。

一方、OmpCに依存した機構のみを保持した変異体を得るために、T4ファージストックからB株に吸着可能なファージを除去する操作を3回繰り返した後に、K12株を指示菌としてシングルプラークを形成させてスクリーニングを行った。その結果、B株に吸着で

きないクローンを4つ手に入れることができた。これらについては今後塩基配列解析を行う予定である。

#### OmpC に依存した吸着に必須なアミノ酸

K12 株の OmpC (OmpC<sub>K12</sub>) と O157 株の OmpC (OmpC<sub>O157</sub>) を比較すると 94% の相同性を示す。OmpC<sub>O157</sub> が T4 ファージの吸着に機能するかどうかを調べるために、K12  $\Delta$ ompC 株にクローン化した ompC<sub>O157</sub> を導入したところ、T4 は吸着できなかった。そこで、ompC<sub>O157</sub> の塩基配列を元に ompC<sub>K12</sub> の配列を一部分導入することによって K12-O157 のキメラ OmpC を発現させて T4 の吸着能を調べたところ、loop1、4、5 に存在するアミノ酸配列が K12 型の場合は OmpC<sub>K12</sub> と同じ吸着能を示した。一方、loop7 や膜内領域の配列は O157 型でも K12 型でも吸着能に違いはなかった。loop4 に存在する K12 型特異的配列である 4 アミノ酸についてそれぞれを Ala へ置換したところ Phe → Ala により T4 吸着能は消失した。この Phe は 3 量体を形成する OmpC の立体構造上では外径 25 nm の DT 領域と過不足なく接触する位置関係にあることから、DT が直接相互作用する対象であることが示唆される。また、上記 Phe → Ala 置換 OmpC に吸着可能な T4 ファージ変異体を単離し、塩基配列を解析したところ上述の DT 内 16 アミノ酸領域 (gp37 の 940-955 番目) 内にアミノ酸置換を生じていることがわかった。これらのことから、T4 の吸着は DT 内 16 アミノ酸領域と OmpC の loop1、4、5 の相互作用によって行われることが強く示唆された。

#### 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 5 件)

1. Yasui, R., Washizaki, A., Furihata, Y., Yonesaki, T., and Otsuka, Y. 2014. AbpA and AbpB provide anti-phage activity in *Escherichia coli*. *Genes Genet. Syst.*, 査読あり, 89, 51-60.
2. Naka, K., Koga, M., Yonesaki, T., and Otsuka, Y. 2014. RNase HI stimulates the activity of RnIA toxin in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 査読あり, 91, 596-605.
3. Wei, Y., Gao, Z., Otsuka, Y., Naka, K., Yonesaki, T., Zhang, H., and Dong, Y. 2013. Structure-function studies of *Escherichia coli* RnIA reveal a novel toxin structure involved in bacteriophage resistance. *Mol. Microbiol.*, 査読あり, 90, 956-965
4. Otsuka, Y., and Yonesaki, T. 2012. Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnIA toxins. *Mol. Microbiol.*, 83, 669-681.

5. Koga, M., Otsuka, Y., Lemire, S., and Yonesaki, T. 2011. *Escherichia coli* rnlA and rnlB compose a novel toxin-antitoxin system. *Genetics*, 査読あり, 187, 123-130.

〔学会発表〕(計 25 件)

1. "T4 Alt modifies *E. coli* MazF"  
Abdulraheem Alawneh, Tetsuro Yonesaki, Yuichi Otsuka EMBO Conference on Viruses of Microbes III (Zurich, Switzerland, July 2014)
2. 「大腸菌 rnlAB トキシン-アンチトキシンに關与する RNase HI の機能解析」  
仲 健太、大塚裕一、米崎哲朗 第36回日本分子生物学会(横浜 2014年11月)
3. 「T4ファージ吸着に必要なLPSの糖鎖構造の解析」  
鷲崎彩夏、大塚裕一、米崎哲朗 第36回日本分子生物学会(横浜 2014年11月)
4. 「病原性大腸菌O157株がもつType I トキシン アンチトキシン系z3289-sRNA1の発現制御機構の解析」  
大塚裕一、多田峻佑、増田道明、米崎哲朗 第36回日本分子生物学会(横浜 2014年11月)
5. "T4 ADP-ribosyl transferase Alt modifies *E. coli* MazF"  
Abdulraheem Alawneh, Tetsuro Yonesaki, Yuichi Otsuka 第36回日本分子生物学会(横浜 2014年11月)
6. 「T4ファージの宿主特異性に関わる OmpC認識部位の解析」  
川口真里奈、鷲崎彩夏、大塚裕一、米崎哲朗 第36回日本分子生物学会(横浜 2014年11月)
7. "The Function of T4 Phage Gene *dda.2*"  
齊 丹、大塚裕一、米崎哲朗 第35回日本分子生物学会(神戸 2013年12月)
8. 「OmpC、LPSとT4ファージの吸着能」  
鷲崎彩夏、大塚裕一、米崎哲朗 第35回日本分子生物学会(神戸 2013年12月)
9. 「T4ファージの宿主特異性の解析」  
川口真里奈、鷲崎彩夏、大塚裕一、米崎哲朗 第35回日本分子生物学会(神戸 2013年12月)
10. 「病原性大腸菌 O157 株が持つ Type I トキシン-アンチトキシンシステム z3289-sRNA1 の解析」  
大塚裕一 米崎哲朗 第9回大腸菌研究会(滋賀 長浜 2012年6月)
11. 「Toxin-Antitoxin systems in *Escherichia coli* O157 and Bacteriophage T4 infection」  
大塚裕一 米崎哲朗 World Congress of Microbes 2012(中国 広州 2012年7月)
12. 「Relationship between Toxin-Antitoxin systems in *Escherichia coli* and Bacteriophage T4 infection」  
大塚裕一 古賀光徳 米崎哲朗 第86回日本細菌学会(千葉 幕張 2013年3月)
13. 「Rapid Degradation of *Escherichia coli*

mRNAs Induced by Bacteriophage T4 Infection」

齐丹、大塚 裕一、米崎 哲朗 35 回日本分子生物学会 (福岡、2012 年 12 月)

14. 「RNase LS 活性に必要な成分の同定」

仲 健太、古賀 光徳、大塚 裕一、米崎 哲朗、第 9 回 21 世紀大腸菌研究会 (滋賀、2012 年 6 月)

15. 「大腸菌 RNase HI は RNase LS 活性を促進する」

仲 健太、古賀 光徳、大塚 裕一、米崎 哲朗、第 35 回 日本分子生物学会 (福岡、2012 年 12 月)

16. 「大腸菌 YfjL と YfjK は DNA 複製を阻害することにより T4 ファージ増殖を抑制する」

安居良太、大塚裕一、米崎哲朗、第 4 回ファージ研究会 (群馬、2012 年 9 月)。

17. 「大腸菌 O157 株における T4 ファージ吸着不能の原因解明」

鷲崎 彩夏、大塚 裕一、米崎 哲朗 第 9 回 21 世紀大腸菌研究会 (滋賀、2012 年 6 月)

18. 「大腸菌 O157 株における T4 ファージ吸着不能の原因解明」

鷲崎 彩夏、大塚 裕一、米崎 哲朗 第 4 回ファージ研究会 (群馬、2012 年 9 月)

19. 「腸管出血性大腸菌 O157 株における T4 ファージ増殖不能の原因解明」

鷲崎 彩夏、大塚 裕一、米崎 哲朗 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡、2012 年 12 月)

20. 「大腸菌新規トキシン-アンチトキシンと T4 ファージ」

大塚 裕一、古賀 光徳、米崎 哲朗、第 8 回 21 世紀大腸菌研究会 (長野、2011 年 5 月)

21. 「大腸菌 RNase LS 活性に関する因子の同定」

仲 健太、古賀 光徳、大塚 裕一、米崎 哲朗、第 8 回 21 世紀大腸菌研究会 (長野、2011 年 5 月)

22. 「大腸菌新規トキシン-アンチトキシンと T4 ファージ」

大塚 裕一、古賀 光徳、米崎 哲朗、第 83 回日本遺伝学会 (京都、2011 年 9 月)

23. 「Escherichia coli YfjL and YfjK inhibits the propagation of bacteriophage T4 by impeding synthesis of T4 late proteins」

安居 良太、大塚 裕一、降旗 裕子、米崎 哲朗、第 34 回日本分子生物学会 (横浜、2010 年 12 月)

24. 「大腸菌 O157 株における T4 ファージ増殖不能の原因解明」

鷲崎 彩夏、大塚 裕一、米崎 哲朗、第 34 回日本分子生物学会 (横浜、2011 年 12 月)

25. 「RNase LS 活性に必要な成分の同定」

仲 健太、古賀 光徳、大塚 裕一、米崎 哲朗、第 34 回日本分子生物学会 (横浜、2011 年 12 月)

〔図書〕(計 1 件)

米崎 哲朗 他、化学同人、ベーシック 分子生物学、2014

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

米崎 哲朗 (YONESAKI, Tetsuro)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 90115965

(2) 研究分担者

大塚 裕一 (OTSUKA, Yuichi)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 10548861

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: