

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06154

研究課題名(和文)原子構造に基づく黄色ブドウ球菌ファージS13'の感染マシナリーの解明

研究課題名(英文)Structure analysis of Staphylococcus bacteriophage S13'

研究代表者

宮崎 直幸 (Miyazaki, Naoyuki)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：00634677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌感染症に対するファージ療法の実用化を目指し、黄色ブドウ球菌ファージS13'とS6の感染機構をクライオ電子顕微鏡単粒子解析により調べた。ファージS13'は頭部の直径が約50 nm、尾部の長さが約40 nmの非収縮性の尾部を持つ小型のポドウイルス科のファージであり、ファージS6は直径約140 nm、尾部の長さが約250 nmの収縮性の尾部をもつ巨大なマイオウイルス科のファージである。S13'の解析では、ファージを構成するタンパク質のほぼ全ての原子モデルの構築ができた。一方で、S6では、収縮前後の尾部の構造を決定することができ、そこから尾部の収縮機構を解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄色ブドウ球菌感染症では、抗菌薬の過剰な使用により、耐性菌が蔓延し、抗菌薬による治療は困難に直面している。その代替療法として有望視されているものが、最近に感染するウイルス(バクテリオファージ)の溶菌活性を利用するファージ療法である。しかし、そのファージ療法に用いるファージの感染・増殖機構に関わる構造生物学的な研究は少なく、非常に遅れている。本研究では、ファージ療法に用いることができる黄色ブドウ球菌ファージを対象として、その宿主認識・感染機構を明らかにするために、黄色ブドウ球菌ファージS13'とS6の構造を決定した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the infection mechanisms of Staphylococcus bacteriophages S13' and S6 by cryo-electron microscopy for practical and effective application of phage therapy for the Staphylococcus aureus infectious diseases. The S13' is a small phage in the Podoviridae family with a head diameter of about 50 nm and a non-contractile tail length of about 40 nm, while the S6 is a large Myoviridae phage with a diameter of about 140 nm and a contractile tail length of about 250 nm. We succeeded to build atomic models for almost all of the proteins that make up the phage particle. On the other hand, we determined the tail structures of S6 before and after contraction, and then we reveals the contractile mechanism of the tail.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 単粒子解析 構造解析 バクテリオファージ ウイルス 感染機構 宿主認識
ファージ療法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌感染症では、抗菌薬の過剰な使用により耐性菌が蔓延し、抗菌薬による治療は困難に直面している。それゆえ、抗菌薬に依存しない治療法の開発が強く望まれている。その代替療法として最も有望視されているものが、細菌に感染するウイルス(バクテリオファージ)の溶菌活性を利用するファージ療法である。溶菌性ファージは、宿主細菌に感染し、細菌内部で増殖した後に、細菌を死滅させながら、細胞外へ放出され、次の感染に移行する。このファージの感染・増殖のサイクルは、宿主となる細菌が存在する限り続き、最終的に患者の体内から病原細菌を死滅させることができる。この作用機序は既存の抗菌薬とは全く異なるので、薬剤耐性菌にも作用する。さらに、抗菌薬は作用スペクトラムが広く、腸内細菌叢などに潜み病原性をもたず日和見感染を防ぐ役目も果たしている善玉細菌にも作用してしまいが、ファージは抗生物質に比べ特異性が高く、ヒトや動物に無害なだけでなくそのような善玉細菌にも一般に無害であり、ほとんど副反応を起こさないと考えられている。一方で、この高い特異性のために、感染症治療に用いるには、ファージの宿主認識・感染の仕組みを理解した上で、感染細菌種を特定し、ファージを適切に用いる必要がある。汎用性を上げるために、複数のファージを混ぜ合わせたファージカクテルを処方する方法も考案されているが、ファージの組み合わせを考える際にもファージの宿主認識・感染機構を理解することは非常に有用である。ところが、黄色ブドウ球菌ファージの原子構造に基づく宿主認識・感染機構に関する情報は殆どないのが現状である。そして、その知識の欠如も伴って、ファージ療法の実用化には未だ至っていない。

2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌感染症に対するファージ療法の実用化を目指して、有用なファージの探索、単離、宿主特異性を調べる研究は、これまで多くの取り組みがなされてきた。さらに、家畜や実験動物を使ったファージ療法を実現するための基礎研究も行われている。一方で、そのファージ療法に用いるファージの感染・増殖に関わる構造生物学的な研究は少なく、非常に遅れている。その原因の1つは、ファージの感染・増殖機構に関する研究が、扱いやすい非病原性の大腸菌やシアノバクテリアに感染するファージ(T4ファージなど)で主に行われてきたという経緯に起因する。実際、黄色ブドウ球菌はグラム陽性菌で、厚いペプチドグリカン層で細胞が覆われており、これまで研究で使われてきた大腸菌のようなグラム陰性菌とは細胞表面構造が全く異なり、大腸菌ファージから得られた感染・増殖機構に関する知見をそのまま黄色ブドウ球菌ファージへ適用できない。さらに、黄色ブドウ球菌に感染するファージ群においても、そのファージの感染・増殖機構は種ごとに異なり実に多様である。そのため、応用を視野にいれる場合は、実際にファージ療法で用いるファージを対象にして研究をすることが非常に重要となってくる。それゆえ、本研究では、ファージ療法に用いることができる黄色ブドウ球菌ファージを対象としてその宿主認識・感染機構を原子レベルで理解することを目的とした。そして、本研究より得られた成果は、社会的に問題となっているMRSA感染症治療への新しい治療法の創出へと繋がり、その波及効果は医療分野から畜産分野まで非常に大きなものが期待でき、これまでのファージの構造生物学的な研究とは全く質の異なる研究であると考えられる。その社会的意義の高さに加え、学術的な面では、厚いペプチドグリカン層に覆われたグラム陽性菌をファージがどのように認識し、感染しているのかという、ウイルス学的、生物学的に新しい知見が得られると期待できる。さらに、ファージの構造は生体分子の中でも特に巨大で複雑なものの一つであり、特にファージの尾部は、ゲノムを宿主に注入する際に大きな構造変化を伴って機能する巨大な分子装置である。そのようなファージの全原子構造を決定し、その構造変化を原子レベルで捉えるための構造解析のノウハウやそこから得られる知見は、生物物理学、構造生物学の発展にも寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、黄色ブドウ球菌ファージの宿主認識・感染機構を、原子レベルで明らかにするために、(1)非収縮尾部をもつポドウイルス科に属するファージ S13' と(2)収縮尾部をもつマイオウイルス科に属するファージ S6 の構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析により決定した。

(1)ファージ S13'

小型の黄色ブドウ球菌ファージ S13' は、頭部が直径約 50 nm、尾部が約 40 nm の長さを持っている。精製したファージ S13' の電子顕微鏡写真を最先端クライオ電子顕微鏡 Titan

Kriosを用いて、約1万枚撮影した。そして、その画像を用いて、ファージS13'の構造を解析した。

(2) ファージS6

大型の黄色ブドウ球菌ファージS6は、ゲノムサイズ270 kbp、全長約500 nmにもなる巨大ファージである。その構造は、頭部は直径140 nmの正二十面体対称をもつ球状の頭部と、約300 nmの長さの収縮性の尾部から構成されている。さらに、尾部の先端には、約36 nmにもなる非常に長い針状の構造があることも分かっている。精製したファージS6の電子顕微鏡写真を最先端クライオ電子顕微鏡Titan Kriosを用いて25,000枚以上撮影した。そして、その画像から、頭部および尾部の領域の画像を切りだし、尾部と頭部を別々に解析した。

4. 研究成果

(1) ファージS13'の構造解析

ファージS13'の頭部の構造を正二十面体対称を用いて3.1 Å分解能で決定した。その密度図に基づいて、頭部を構成する主要キャプシドタンパク質gp19とその裏打ちタンパク質gp20の原子モデルの構築をおこなった。尾部は、約1万の粒子像から、尾部を構成する部分構造にマスクかけて、局所三次元構造精密化をおこなうことにより、3.7~3.9 Å分解能の構造を決定した。そのクライオ電子顕微鏡密度図に基づいて、尾部を構成するほぼ全てのタンパク質の原子モデルの構築に成功した。尾部先端に位置するTail lysinに関しては、その原子モデルの構築はできなかったが、それが2量体の形で存在しているという新規の知見も得られた。また、これまでに報告されているファージの構造と比較することにより、ファージS13'が宿主に感染する際には、尾部先端の構造変化を伴うということが示唆された。

(2) ファージS6の構造解析

撮影した電子顕微鏡画像から、頭部の画像を切り出し、正二十面体対称を用いることにより、3.6 Å分解能で構造を決定した。頭部は、直径が約140 nmにもなり、その高分解能での構造決定には、倍率異方性の補正やエバルド球の補正が非常に効果があった。その得られた密度図に対し、主要キャプシドタンパク質の原子モデルの構築に成功した。また、頭部の構造安定化に寄与していると考えられるキャプシド補強タンパク質の構造も一部明らかにすることができた。

一方、尾部の解析では、撮影した電子顕微鏡写真から、収縮前、収縮後の尾部の画像を、それぞれ約15万および約2万枚切り出した。収縮性の尾部は、螺旋対称を持っており、その螺旋対称性を課した解析を行うことで、収縮前後の尾部の構造を、それぞれ3.0 Å、3.1 Å分解能で決定した。この収縮性の尾部は、内層の剛直なrigid tubeと、それを覆う外側のtail sheathの2層からなり、感染の際には、tail sheathが収縮することで、rigid tubeが細胞を貫通する。今回解析した構造から、rigid tube、tail sheath構成タンパク質の原子モデルの構築に成功し、収縮前後におけるそれらタンパク質の構造比較から、尾部の収縮機構が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 Chen Nai-Chi, Yoshimura Masato, Miyazaki Naoyuki, Guan Hong-Hsiang, Chuankhayan Phimonphan, Lin Chien-Chih, Chen Shao-Kang, Lin Pei-Ju, Huang Yen-Chieh, Iwasaki Kenji, Nakagawa Atsushi, Chan Sunney I., Chen Chun-Jung | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 The atomic structures of shrimp nodaviruses reveal new dimeric spike structures and particle polymorphism | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 72 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0311-z | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------------|
| 1. 著者名 Nakamichi Yusuke, Miyazaki Naoyuki, Tsutsumi Kenta, Higashiura Akifumi, Narita Hirota, Murata Kazuyoshi, Nakagawa Atsushi | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 An Assembly Intermediate Structure of Rice Dwarf Virus Reveals a Hierarchical Outer Capsid Shell Assembly Mechanism | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Structure | 6. 最初と最後の頁 439 ~ 448.e3 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2018.10.029 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------------|
| 1. 著者名 Okamoto Kenta, Ferreira Ricardo J., Larsson Daniel S.D., Maia Filipe R.N.C., Isawa Haruhiko, Sawabe Kyoko, Murata Kazuyoshi, Hajdu Janos, Iwasaki Kenji, Kasson Peter M., Miyazaki Naoyuki | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Acquired Functional Capsid Structures in Metazoan Totivirus-like dsRNA Virus | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Structure | 6. 最初と最後の頁 888 ~ 896.e3 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2020.04.016 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮崎直幸、内山淳平、松崎茂展、村田和義、岩崎憲治 |
| 2. 発表標題 黄色ブドウ球菌ファージS13'のクライオ電顕単粒子解析 |
| 3. 学会等名 日本顕微鏡学会第75回学術講演会(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮崎直幸、内山淳平、松崎茂展、村田和義、岩崎憲治 |
| 2. 発表標題 黄色ブドウ球菌ファージS13'のクライオ電顕単粒子解析 |
| 3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鯉淵航、内山淳平、松崎茂展、村田和義、岩崎憲治、宮崎直幸 |
| 2. 発表標題 巨大黄色ブドウ球菌ファージS6の構造解析 |
| 3. 学会等名 生理研研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮崎直幸 |
| 2. 発表標題 超分子複合体構造のクライオ電顕による解析について |
| 3. 学会等名 第9回日本光合成学会年会およびシンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮崎直幸、内山淳平、松崎茂展、村田和義、岩崎憲治 |
| 2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による黄色ブドウ球菌ファージS13'の近原子分解能単粒子解析 |
| 3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第74回学術講演会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮崎直幸、内山淳平、松崎茂展、村田和義、岩崎憲治 |
| 2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による黄色ブドウ球菌ファージS13'の近原子分解能単粒子解析 |
| 3. 学会等名 第7回 ファージ研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮崎直幸、内山淳平、松崎茂展、村田和義、岩崎憲治 |
| 2. 発表標題 The near-atomic resolution cryo-EM structure of the infectious Staphylococcus bacteriophage S13' |
| 3. 学会等名 第56回生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮崎直幸 |
| 2. 発表標題 超分子複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析 (Cryo-electron single particle analysis of supramolecular complexes) |
| 3. 学会等名 日本結晶学会 平成30年度年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮崎直幸、内山淳平、松崎茂展、村田和義、岩崎憲治 |
| 2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による黄色ブドウ球菌ファージS13'の近原子分解能単粒子解析 |
| 3. 学会等名 生理研研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------|--|-------------------------------------|----|
| 研究 分担 者 | 内山 淳平 (Uchiyama Jumpei) (20574619) | 麻布大学・獣医学部・講師 (32701) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|