

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18521

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌ファージS6の感染機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the infection mechanism of Staphylococcus bacteriophage S6

研究代表者

宮崎 直幸 (Miyazaki, Naoyuki)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：00634677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌に対するファージ療法の実用化には、黄色ブドウ球菌ファージの感染・増殖機構を理解する必要がある。そこで、黄色ブドウ球菌ファージS6、S13'、S25-3のクライオ電顕による構造解析をおこなった。Zernike位相差クライオ電顕の観察により、S6ファージの尾部先端には、非常に長い針状構造が見られていたが、それは他の黄色ブドウ球菌ファージS13'やS25-3の尾部先端には見られなかった。この結果は、これらのファージの宿主認識機構が異なっていることを示唆している。また、S13'のクライオ電顕単粒子解析では、頭部と尾部の主要な構造に関しては、近原子分解能で構造を決定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Knowledge of the molecular mechanisms of the phage infection and replication is essential for practical use of phage therapy. To understand those mechanisms, we investigated the structures of Staphylococcus bacteriophages S6, S13', and S25-3 by cryo-electron microscopy. Zernike phase contrast cryo-EM observations revealed that S6 phage has a long fiber-like structure at the tip of the tail, which is quite different from other Staphylococcus bacteriophages S13' and S25-3. These observations suggested that these bacteriophages recognize their host cells in different manners. In addition, we succeeded to determine the major tail and head structures of phage S13' at near atomic resolutions.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 電子顕微鏡 ウイルス ファージ 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌感染症では、日本の入院患者から分離される 50~70%がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) であると報告されている。それゆえ、抗菌薬 (抗生物質) に依存しない治療法の開発が強く望まれている。その代替療法の候補として近年注目されているのが、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。ファージは宿主である特定の細菌に感染し、細菌内部で増殖した後、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、宿主となる病原体が存在する限り続き、患者の体内から病原細菌を消滅させることができる。このファージ療法を実用化するには、ファージの感染・増殖機構に対する原子レベルでの理解が必要不可欠である。ところが、ファージの感染・増殖機構に関する研究は、グラム陰性菌である大腸菌に感染するファージ (T4 ファージなど) を中心にこれまで行われており、黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌に感染するファージでの研究はほとんど進んでいない。グラム陽性菌の細胞表面は厚いペプチドグリカン層で覆われているため、グラム陰性菌ファージの宿主認識機構がそのままグラム陽性菌ファージに適用できるとは考えにくい。その上、ファージは種ごとに異なる感染・増殖機構を持っていることが多く、実際にファージ療法に用いるファージを対象にして研究をおこなうことが、応用を視野に入れる場合非常に重要となってくる。

ファージは、宿主の仕組みを巧妙に利用して感染増殖する。それゆえ、それらの感染増殖機構を正しく理解するには、ファージの構造を詳しく調べることに加えて、宿主にどのように感染し、宿主内でどのように増殖しているのかということも調べる必要がある。そのようなファージの感染機構を原子レベルで理解する方法としては、クライオ電子顕微鏡による構造解析が適している。近年、クライオ電子顕微鏡のハード・ソフトウェアの発展は目覚ましく、精製した試料では、ファージやウイルスだけでなく膜タンパク質複合体でも単粒子解析法により原子レベルの分解能で構造を決定できるようになっている。その上、ファージやウイルスの感染過程も、クライオ電子線トモグラフィーにより数 nm の分解能で詳しく調べることが可能となってきた。申請者も、ウイルスの感染・増殖機構を原子レベルで理解するために、クライオ電子顕微鏡と X 線結晶構造解析などの構造生物学的手法を用いてこれまで研究を行ってきた。そして、それらの研究において、ウイルスの自己組織化機能、ウイルス進化、ワクチン開発に関わる知見等の重要な成果を得ることに成功してきている。また、これらの構造解析に

必要となる電子顕微鏡における先端技術の構築にも積極的に取り組んできている。そのような経験と培った技術を生かして、黄色ブドウ球菌ファージの感染・増殖機構の構造解析を進めているが、クライオ電子顕微鏡はその試料調製法も含めて、まだ課題も多い。例えば、無染色であるがゆえにコントラストが低いこと、厚い試料を観察できないこと、電子線トモグラフィーではデータ欠損領域が生じることなどである。ファージの感染機構を解明するには、これらの問題を解決する必要がある、それらのクライオ電子顕微鏡の技術的課題にも本研究では取り組んでいく。

## 2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌感染症では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の蔓延が問題となっており、日本では毎年約 1000 人が MRSA 感染症により死亡している。MRSA 感染症の新しい治療法として、ファージの溶菌活性を利用するファージ療法が注目されているが、その実用化には、ファージの感染・増殖機構をきちんと理解する必要がある。本研究では、ファージ療法に用いる黄色ブドウ球菌ファージの感染機構をクライオ電子顕微鏡により原子レベルで解明することを目指している。本研究で得られる成果は、ファージ療法の実用化へと繋がるだけでなく、グラム陽性菌ファージがどのように厚いペプチドグリカン層に覆われた宿主を認識し、ゲノムを宿主内へと送り込んでいるのかという生物学的・ウイルス学的にも新規の知見を与えるものである。

## 3. 研究の方法

本研究では、黄色ブドウ球菌ファージの感染機構を、クライオ電子顕微鏡を用いて調べた。当初、S6 と呼ばれる巨大なファージを主要な研究対象としていたが、小型な黄色ブドウ球菌ファージ S13' も研究対象として加えた。

### (1) 黄色ブドウ球菌ファージの尾部先端の構造解析

大型の黄色ブドウ球菌ファージ S6 は、Jumbo phage に分類され、収縮性の尾部の先端には、約 36 nm にもおよぶ非常に長い針状構造があることが、Zernike 位相差クライオ電顕の観察によって分かっている。しかし、それがブドウ球菌ファージにおいて共通の特徴なのかそれとも S6 ファージに特有な特徴なのか分かっていなかったため、S6 とは大きく異なる S13' と S25-3 という黄色ブドウ球菌ファージの尾部の構造を Zernike 位相差クライオ電顕で調べた。S13' は、非収縮性の短い尾部を持つ小型のファージでありポドウイルス科に分類されている。一方、S25-3 は、収縮性の長い尾部を持ち、サイフォウイルス科に分類されている。これらのファージ

尾部の構造を S6 の構造と比較した。

#### (2) 黄色ブドウ球菌ファージ S13' のクライオ電顕構造解析

S13' ファージは、頭部と尾部がそれぞれ約 500 Å から構成された全長約 1,000 Å の小型の黄色ブドウ球菌ファージである。この小型の S13' ファージの頭部および尾部の原子構造をクライオ電顕単粒子解析によって決定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 黄色ブドウ球菌ファージの尾部先端の構造解析

S6 ファージとは大きく異なるファージである S13' と S25-3 の尾部の構造を Zernike 位相差クライオ電顕で詳細に比較した。その結果、S6 の尾部先端で観察された約 36 nm にもおよぶ非常に長い針状構造は、他の S13' や S25-3 というファージでは観察されなかった

(図 1)。従って、これらのファージの宿主の認識機構は大きく異なっている可能性が示唆された。今後は、ファージ尾部の形態レベルの比較だけでなく、タンパク質の構造レベルで、これらファージ尾部の構造比較をおこない、実際にこれらファージの宿主認識機構の類似点・相違点を調べていく必要があると考えている。

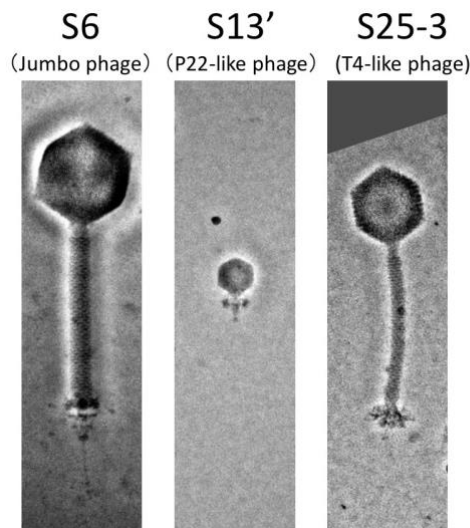


図 1. 位相差クライオ電子顕微鏡による黄色ブドウ球菌ファージの尾部構造の比較

#### (2) 黄色ブドウ球菌ファージ S13' のクライオ電顕構造解析

黄色ブドウ球菌 S13' の頭部と尾部の構造をクライオ電顕単粒子解析で決定した。生理学研究所にある加速電圧 200kV の JEM2200FS で撮影した 199 枚のクライオ電顕写真から、約 10,000 の頭部の画像を切り出して、正二十面体対称を用いて解析した結果、8.5 Å 分解能で構造を決定することができた (図 2)。その構造から、S13' ファージの頭部は、T=4 の

対称をもっていることが判明した。さらに、蛋白質研究所に 2016 年 3 月に導入された最新のサーモフィッシャーサイエンティフィック製の加速電圧 300 kV の最先端クライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いてデータ収集し、頭部と尾部の解析をおこなった結果、到達分解能が格段に上昇した。そして、頭部と尾部の主要部分の構造に関しては、原子分解能 (3.2、3.7 Å) で構造を決定することができた。

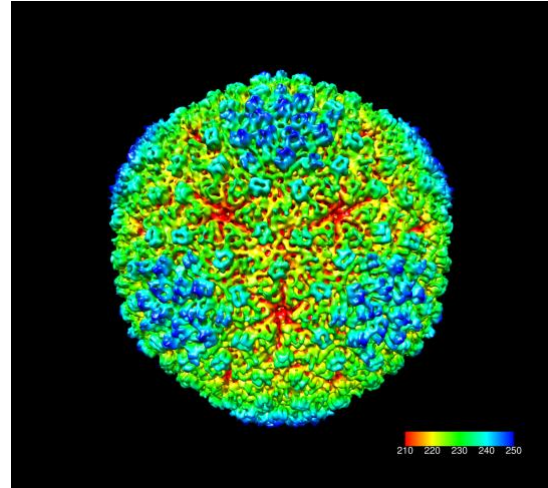


図 2. ファージ S13' の頭部の構造 (8.5 Å 分解能)

### 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 2 件)

- ① Okamoto K, Miyazaki N, Song C, Maia FRNC, Reddy HKN, Abergel C, Claverie JM, Hajdu J, Svenda M, Murata K, Structural variability and complexity of the giant Pithovirus sibericum particle revealed by high-voltage electron cryo-tomography and energy-filtered electron cryo-microscopy, *Sci Rep.*, 7 (1): 13291 (2017), 査読有.
- ② Okamoto K, Miyazaki N, Reddy HKN, Hantke MF, Maia FRNC, Larsson DSD, Abergel C, Claverie JM, Hajdu J, Murata K, Svenda M, Cryo-EM structure of a Marseilleviridae virus particle reveals a large internal microassembly, *Virology*, 516: 239-245 (2018), 査読有.

[学会発表] (計 1 4 件)

- ① 宮崎直幸、内山淳平、松崎茂展、村田和義、Cryo-EM study of bacteriophage S6 of *Staphylococcus aureus* (招待講演)、2015 年 5 月 13-15 日、第 7 1 回日本顕微鏡学会学術講演会、京都国際会館、京都、京都

- ② 宮崎直幸、Whole cell cryo-electron tomography revealed novel budding and release machinery of a non-enveloped virus, Rice dwarf virus (招待講演)、2016年2月19日、蛋白研セミナー「Introduction and overview of cryo-electron microscopy」、蛋白質研究所、吹田、大阪
- ③ 宮崎直幸、大村敏博、村田和義、岩崎憲治、クライオ電子線トモグラフィ法によるウイルスの細胞内3次元構造解析、2016年6月14-16日、第72回日本顕微鏡学会学術講演会、仙台国際センター、仙台、宮城
- ④ 宮崎直幸、岩崎憲治、電顕構造解析と相關構造解析(招待講演)、2016年8月1-2日、PF研究会「次世代に向けたタンパク質結晶構造解析の自動化・効率化」、高エネルギー加速器研究機構、つくば、茨城
- ⑤ 宮崎直幸、岩崎憲治、Cryo-electron microscopy single particle analysis at near atomic resolution (招待講演)、2016年11月25-27日、第54回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、つくば、茨城
- ⑥ 宮崎直幸、岩崎憲治、クライオ電子顕微鏡による近原子分解能構造解析(招待講演)、2017年3月21-22日、蛋白研セミナー「真核細胞のオルガネラ研究最前線」、蛋白質研究所、吹田、大阪
- ⑦ 宮崎直幸、岩崎憲治、創薬を目指した近原子分解能クライオ電子顕微鏡単粒子構造解析、2017年5月30日-6月1日、第73回日本顕微鏡学会学術講演会、札幌コンベンションセンター、札幌、北海道
- ⑧ 宮崎直幸、State-of-the art cryo-EM system provided by AMED platform project for supporting drug discovery and life science research (招待講演)、2017年9月6日、蛋白研セミナー「Recent advantage in the Frontiers of the Cryo-EM sciences」、蛋白質研究所、吹田、大阪
- ⑨ 宮崎直幸、内山淳平、松崎茂展、村田和義、岩崎憲治、The head structure of the Staphylococcus aureus phage S13'、2017年9月19-21日、第55回日本生物物理学会年会、熊本大学、熊本、熊本
- ⑩ 宮崎直幸、クライオ電子顕微鏡単粒子解析法によるウイルスや蛋白質複合体の近原子分解能構造解析(招待講演)、2017年9月27日、ウイルス研セミナー「ウイルス研究の潮流シリーズ」、京都大学、京都、京都
- ⑪ 宮崎直幸、Structural analysis of viruses by cryo-electron microscopy and tomography (招待講演)、2017年10月3-4日、日英構造生命科学フォーラム2017「Frontiers in Cryo-Electron

Microscopy」、Leicester, UK

- ⑫ 宮崎直幸、内山淳平、松崎茂展、村田和義、岩崎憲治、黄色ブドウ球菌ファージS13'のクライオ電顕単粒子構造解析、生理研研究会2017「クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子構造解析」黄色ブドウ球菌ファージS13'のクライオ電顕、2017年11月28日、岡崎カンファレンスセンター、岡崎、愛知
- ⑬ 宮崎直幸、内山淳平、松崎茂展、村田和義、岩崎憲治、ファージ療法の実用化を目指した黄色ブドウ球菌ファージのクライオ電顕構造解析(招待講演)、2017年12月2日、日本顕微鏡学会第60回記念シンポジウム、ニューウェルシティ宮崎、宮崎、宮崎
- ⑭ 宮崎直幸、創薬の推進に資する近原子分解能クライオ電顕構造解析技術(招待講演)、2017年12月12日、理研シンポジウム「第18回分析・解析技術と化学の最先端」、理化学研究所、和光、埼玉

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/synthesis/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 直幸 (MIYAZAKI NAOYUKI)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：00634677