

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24570123  
研究課題名(和文) Muファージサブユニットの構造と分子集合の解析

研究課題名(英文) Structural study of bacteriophage Mu

## 研究代表者

武田 茂樹 (Takeda, Shigeki)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：80282854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：Muファージgp49、gp50複合体、gp52、gp51複合体、gp36はいずれも組換え体として精製し、収量はそれぞれ1-5mg/Lであった。gp49、gp50複合体とgp36について結晶を得ることができ、立体構造を決定した。gp49、gp50複合体の構造から、テイルファイバーgp49はシートやヘリックスが繰り返してできた構造の繰り返しからなることが明らかとなった。また、シャペロンgp50はgp49のC端に結合することがわかった。また、ネックサブユニットgp36は他のファージのものとは異なり、単体ではリング構造をとらず単量体であったが、その立体構造は他のファージのものによく似ていた。

研究成果の概要(英文)：We purified Mu phage tailfiber (gp49-gp50 complex) and neck subunit (gp36). We also crystallize them and determined their three dimensional structure. Tailfiber consisted of trimer of beta-strand and beta-helix. Neck gp36 was monomer and did not form ring structure.

研究分野：生化学

キーワード：バクテリオファージ 形態形成 分子集合

### 1. 研究開始当初の背景

バクテリオファージ Mu は大腸菌に感染するファージであり、正二十面体の頭殻と、収縮性の尾鞘を持つ。Mu ファージは全塩基配列が決定されている、多くの変異体がすでに得られている、電子顕微鏡で構造を観察できるほど大きな構造変化を起こす、球殻構造・円筒構造・繊維状構造など種々の興味ある構造を持つ、試験管内再構成を行うことができる、といった研究材料として使いやすい特徴を持っている。ウイルス粒子は自己のゲノム DNA のキャリアーであると同時に、DNA を宿主細胞に効率良く注入するための分子機械であると考えることが出来る。したがって、ウイルス構造の構築原理や構造変化の研究は、生物および蛋白質の機能の理解のためだけでなく、分子機械の設計やナノテクノロジーの開発という観点からも重要である。我々はこれまで Mu ファージの形態形成、分子集合の理解にむけて基盤サブユニット gp44 や gp45 の X 線構造解析を行ってきた。

### 2. 研究の目的

タンパク質の分子集合は生体制御の観点からだけでなく分子が自律的に集合する超分子形成プロセスの典型的な例として広く研究されている。中でもウイルス粒子の自律的形態形成・自己組織化過程では相互作用によってサブユニットが結合していく順序が決定されており、さらに近年のタンパク質立体構造解析技術の発達と電子顕微鏡による 3 次元画像再構成技術の普及により複合体の構成について多くの知見が得られるようになり、さらに詳しい研究が望まれている。我々はこれまでに Mu ファージを用いて、基盤などの構成サブユニットを網羅的に精製しておりいくつかの構造解析を成功させた。本研究ではこれまでの研究をさらに推し進め、特に以下の 2 点に集中して研究を進めた。(1) 尾繊維の構造形成の過程を解明するために、尾繊維とそのシャペロンの複合体を精製し、その構造解析をおこなった。このことはまた、幅広い宿主に対する尾繊維の認識や吸着の機構を解明することにも繋がる。(2) 頭部と尾部を結合しているネック部分の構造形成について理解するために、構成サブユニットの精製と解析を行った。

### 3. 研究の方法

Mu ファージテイルファイバーの gp49, gp52 とそれに働くシャペロン gp50, gp51 の複合体およびネックサブユニットの gp36 の発現と精製を行い、結晶化と X 線構造解析によってその構造を決定した。

(1) 尾繊維を精製するにあたり、尾繊維の構造形成にはそれぞれに特異的なシャペロン、尾繊維 gp49 にはシャペロン gp50 が、尾繊維 gp52 にはシャペロン gp51 が必要である

と考えられている。そこで尾繊維と特異的シャペロンの共発現系を構築するために、gene49 と gene50 が順に並んだ遺伝子断片を PCR で増幅し、pET21a に挿入した。この際に gene50 の 3' -末端に His-Tag 配列が付加するように発現ベクターを設計した。作成した発現ベクターを用いて発現菌を作成し、発現菌の破碎液から組み換え体タンパク質を Ni アフィニティーカラムとゲル濾過カラムを用いて精製した。収量は 1-5mg/L であった。精製後、ゲル濾過カラムで得られた単一なピークを SDS-PAGE と超遠心分離で分析すると、尾繊維 gp49 と特異的シャペロン gp50 が安定的に複合体を形成していることが分かった。また尾繊維 gp52 と特異的シャペロン gp51 の共発現系においても同様に複合体が得られた。また、尾繊維とシャペロンの組み合わせを天然とは異なる組み合わせ (gp49+gp51 複合体と gp52+gp50 複合体) で発現させたところ、当初の予想とはことなり尾繊維とシャペロンの組み合わせは非天然型であっても正しい尾繊維を構築できることがわかった。精製された試料についてそれぞれ 384 通りの溶媒条件で結晶化を試みた。その結果、gp49+gp50 複合体と gp36 について結晶を得ることができ、立体構造を決定した。

(2) ゲノム解析などの結果から gene35、36 がネックサブユニットをコードしていることが示されている。本発表では、gene36 の産物である gp36 についてのまず検討した。gene36 を pET21a に挿入し gp36 とヒスチジンタグの融合タンパク質を T7 発現系で発現させて精製し、超遠心分析で分子量を決定することにより、試験管内で単量体であることが確認できた。更に結晶化を行い、Spring-8 の放射光を利用した X 線結晶解析により、1.8 Å 解析能で gp36 の立体構造を決定した。Dal i アルゴリズムにより立体構造の相同性検査を行った。

### 4. 研究成果

(1) gp49 と gp50 を共発現させて菌体細胞膜への結合能をもった gp49 とそれに結合した gp50 を精製することができた。同様にしてもう一つの尾繊維とそのシャペロンである gp52 と gp51 共発現させてその複合体を精製することができた。gp49, gp50 複合体の構造から、テイルファイバー gp49 は シートやヘリックスが繰り返してできた構造の繰り返しからなることが明らかとなり、他のファージのテイルファイバーとの比較することができた。また、シャペロン gp50 は gp49 の C 端に結合することがわかった。シャペロンは一般的には基質の構造形成終わると解離してしまうので、基質とシャペロンの複合体を得ることを困難である。本研究ではシャペロンと基質の複合体構造を明らかにすることで構造形成の仕組みを構造的に理解できる可能性を示した。すなわち、gp49 の誤った構造形成 (おそらくは球状へのフォルデ

ィング)をどのように gp50 が防いでいるのかを予想することができた。我々の結果では得られた構造では棒状の尾繊維のC端側にシャペロンが結合していた。したがって一般的な理解とは異なり、シャペロンはタンパク質合成が進むN端側から構造を形成していくわけではなく、C端側が正常な構造を形成できず異常な構造を形成してしまうことを防いでいると考えられた。今後はシャペロン gp50 がテイルファイバーgp49 の構造形成に働く役割やテイルファイバーgp49 が宿主菌体膜の糖鎖をどのように認識するかをより明らかにしていくことが重要である。シャペロンとその基質の複合体の立体構造解析は例が少なく、より高分解能の結果を出していくことによってインパクトのある成果をあげることができるであろう。また、尾繊維とシャペロンの組み合わせが非天然型 (gp49+gp51 複合体と gp52+gp50 複合体) であっても機能的に成立することが示されたことは、gp50, gp51 といったシャペロンが他の繊維状タンパク質の構造形成にも利用できる可能性を示しており、興味深い。たとえば、繊維状タンパク質の代表例であるコラーゲンについては、その特異的分子シャペロン HSP47 が哺乳動物の個体の正常発生にとって必須の分子シャペロンであることが知られている。HSP47 欠損マウスにおいては、コラーゲン分子の3本鎖形成に異常が見られ、コラーゲン繊維や基底膜の形成不全を起こす。コラーゲンの異常な蓄積を特徴とする各種繊維化疾患においても特異的分子シャペロン HSP47 の機能不全や発現不良が原因となっている。本研究の結果と関連させて HSP47 の構造形成、機能発現の仕組みを構造的に理解することで、病態の原因となる繊維化を抑制できる可能性が見いだせることが期待できる

(2) ネックサブユニット gp36 は他のファージのものとは異なり、単体ではリング構造をとらず単量体であったが、その立体構造は他のファージのものによく似ていた。X線構造解析の結果、Mu-gp36 は HK97-gp6 サブユニットと高い相同性があることが分かった。HK97-gp6 はネックサブユニットの1つであり、隣接するサブユニットと結合するループ構造によって12量体のリング構造を形成している。Mu-gp36 と HK97-gp6 の立体構造の重ね合わせにより、Mu ファージの gp36 が単量体となった理由はこのループを持たないためではないかと推測した。今後は、gp36 が他のサブユニットと結合してどのようにリング構造を形成するのかを明らかにすることが必要である。なお、本研究では、gp36 が gp35 と同時に共発現させることで結合することも明らかにすることができたが、複合体は凝集体を形成し、その性質はまだ解析できていないため、複合体の凝集を防ぐ条件の検討が重要であると考えられる。我々が本研究で用いた、いくつかのサブユニットを同時に発現させた複合体を形成させる手法は、今後モタ

ンパク質複合体の精製や解析に有用であると期待できる。

#### 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 1件)

N. Tsukamoto, Y. Kanazawa, Y. Shimamori, K. Yoshida, S. Takeda  
Identification of a morphogenetic intermediate of the bacteriophage Mu baseplate  
Advances in Microbiology, 4, 1155-1163(2014)

[学会発表](計 5件)

1. 岩崎拓真, 武田茂樹, 山下栄樹  
バクテリオファージ Mu ネックサブユニットの構造解析  
第3回日本生物物理学会関東支部研究会  
2014年3月7日 神奈川

2. 岩崎拓真, 武田茂樹, 山下栄樹  
バクテリオファージ Mu のネックサブユニットの単離と構造解析  
第5回ファージ研究会  
2014年9月5日 三重

岩崎拓真, 山下栄樹, 中川敦史, 武田茂樹  
バクテリオファージ Mu のネックサブユニット gp36 の結晶構造  
日本分子生物学会  
2014年11月25日 神奈川

坂井康平, 武田茂樹  
Mu ファージ尾繊維タンパク質 gpS と gpS' およびこれらの特異的シャペロン gpU と gpU' の精製  
第5回ファージ研究会  
2014年9月5日 三重

坂井康平, 山下栄樹, 武田茂樹  
バクテリオファージ Mu 尾繊維サブユニットとその特異的シャペロン複合体の精製、構造解析  
日本分子生物学会  
2014年11月25日 神奈川

[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：  
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

<http://stakeda.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

武田茂樹 (Takeda, Shigeki)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：80282854

研究者番号：

80282854

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：