

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440066

研究課題名(和文) 病原性細菌特異的ファージの宿主認識と収縮性ファージ尾繊維構成蛋白質の構造生物学

研究課題名(英文) Structural biology of phage long tail fiber protein and host recognition

研究代表者

金丸 周司 (Kanamaru, Shuji)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：50376951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：T4ファージの近位尾繊維蛋白質gp34のC末端564残基を可溶性3量体として発現し精製・結晶化を行った。結晶構造解析により、gp34のC末端744-1289の立体構造を決定した。その構造は、全長18nmの繊維状であった。細部は、3本鎖 β -ヘリックスや β -プリズム構造などを含めファージ尾部蛋白質共通のドメイン構造であり、ファージの尾部構造蛋白質の進化はパーツとなるドメインの組み合わせにより、感染に必要な機能を獲得していることが示唆された。PP01ファージのレセプター結合蛋白質gp38に関しては、gp37のC末端と共発現することで、可溶性のgp37C-gp38複合体として精製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We over-expressed, purified and crystallized a C-terminal 564 residues of gp34, proximal long tail fiber, of bacteriophage T4. A determined crystal structure of gp34C774-1289 is trimeric fibrous protein which is 18nm long. In detail, there are three-stranded β -helix and β -prism domains which are found in other phage tail protein. Thus we conclude that the phage tail proteins are evolved with utilizing the "tail parts domains" to obtain their ability for their infection. We also purified gp38 as a complex with C-terminal portion of gp37 by co-expression system.

研究分野：構造生物学

キーワード：バクテリオファージ ウイルス 構造蛋白質 繊維状蛋白質 X線結晶構造解析 宿主認識

1. 研究開始当初の背景

バクテリオファージ T4 を含む収縮性ファージは、ファージ尾繊維が宿主バクテリアに結合すると、尾部基盤が構造変化を起こし尾部が収縮し尾管を宿主に突き刺し DNA を注入することで感染が始まる。過去約 20 年の間に Purdue 大学 M. G. Rossmann 教授のグループと我々の共同研究を中心に T4 ファージの構造解析は著しく進展した。個々の尾部構成蛋白質の高分解能結晶構造を電子顕微鏡単粒子解析の低分解能構造に当てはめることにより、感染前後の尾部の構造と構造変化が明らかになった。しかし、尾繊維の立体構造や感染の最初期、すなわち尾繊維が宿主に結合しそのシグナルがどのようにして尾部基盤に伝播するかは、未解決の問題である。本研究では、尾繊維蛋白質群の構造解析によりその解明をめざした。

上記研究と並行して、収縮性ファージ尾部と類似の構造体をもつタイプ 6 分泌システムの構成蛋白質 VgrG 蛋白質 (T4 ファージ注射針蛋白質類似) の構造解析も行った。

2. 研究の目的

本研究は、収縮性ファージの尾繊維構成蛋白質の立体構造と機能、宿主との相互作用の分子メカニズムを明らかにしようとするものである。尾繊維は gp34, gp35, gp36, gp37 (T2 型はさらに gp38) から形成され、そのフォールディングにはファージのもつ分子シャペロン gp57A (T4 型はさらに gp38) が必要である。電子顕微鏡観察により、尾繊維は“く”の字に折れた構造を持ち、gp34 は基盤に近い近位尾繊維蛋白質、gp35 と gp36 はヒンジ部分、gp37 は遠位尾繊維蛋白質である (T2 型ではさらに gp38 が先端に結合)。このうち、T4 型のレセプター結合蛋白質 gp37 の先端 (C 末端) の結晶構造が明らかにされている。本研究では、それぞれの蛋白質とそのドメインを尾繊維シャペロンと共発現し、単離精製・結晶構造解析をめざした。また、タイプ 6 分泌システムの注射針 VgrG 蛋白質の構造解析を目的とし、様々なバクテリアの VgrG 蛋白質とそのドメインの結晶構造解析をめざした。

3. 研究の方法

本研究では、T4 ファージ由来の個々の尾繊維蛋白質 gp34, gp35, gp36, gp37 とその C または N 末端欠失変異体、ならびに T2 型 PP01 ファージのレセプター結合蛋白質 gp38 の大腸菌大量発現系を作成し、カラムクロマトグラフィーを用いて単離精製を行い、結晶化を試みた。結晶化した蛋白質につき結晶構造解析を行った。

同時に、タイプ 6 分泌システムの注射針 VgrG 蛋白質についても、全長ならびに種々の長さ

の N 末端欠失変異体を作成し、単離精製・結晶化・構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) T4 ファージ gp34 全長蛋白質の発現・単離精製・結晶化

gp34 全長蛋白質はシャペロン蛋白質 gp57A と共発現することで、可溶性蛋白質として発現した。これを、硫酸アンモニウム沈殿で分画し、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で精製したところ、SDS-PAGE でほぼ単一のバンドになるまで精製できた。ゲル濾過クロマトグラフィーならびに超遠心分析の結果からファージ粒子中と同様の 3 量体構造を保持していることが分かった。この精製標品に対し結晶化スクリーニングを行ったが、構造解析に適した結晶はいまだ得られていない。

(2) T4 ファージ gp34N 末端欠失変異体の発現・単離精製・結晶化

gp34 全長蛋白質は単離精製できたが、構造解析に適した結晶が得られなかったため、gp34N 末端欠失変異体の発現系を作成し、gp57A と共発現した。複数の gp34 C 末端欠失変異体のうち 726-1289 残基からなる gp34C726-1289 は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で精製した。この精製標品をさらに過熱後トリプシンで処理し安定な 3 量体断片 gp34C781-1289 を得た。これら gp34C726-1289 と gp34C781-1289 のこの精製標品に対し結晶化スクリーニングを行い、構造解析に適した結晶が得られた。

(3) T4 ファージ gp34C の結晶構造解析

まず、セレノメチオニン置換体の gp34C781-1289 結晶を用いて、高エネルギー加速器研究所 BL1A にて分解能 1.9Å 程度の MAD 回折データを収集した。このデータセットを用いて SAD 法ならびに MAD 法を試みたが、位相の決定には至らなかった。同時期に、スペイン Mark J. van Raaij らのグループにより我々の gp34C781-1289 より短い gp34C894-1289 の立体構造が決定されたため、その構造をモデル構造として用いて分子置換法によりの gp34C781-1289 構造を決定した。さらに、gp34C726-1289 結晶についても高エネルギー加速器研究所 BL17A にて分解能 2.9Å 程度の回折データを収集し、上記 gp34C781-1289 構造をモデルとして分子置換法によりの gp34C726-1289 構造を決定した。決定した gp34C726-1289 の構造 (図 1) は、全長 18nm の繊維状 3 量体であり、3 本鎖 β-ヘリックスや β-プリズム構造などを含めファージ尾部蛋白質共通のドメイン構造とともに新規の構造モチーフを有していることが分かった。この新規構造モチーフは、以前より報告されている T4 ファージ尾繊維に複数繰り返し見

られるリピート配列に対応しており、尾繊維の構造形成の主要な構成部分が解明された。以上の結果から、ファージの尾部構造蛋白質の進化はパーツとなるドメインの組み合わせにより、感染に必要な機能を獲得していることが示唆された。

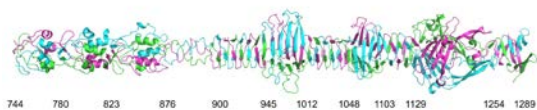


図 1 gp34C⁷²⁶⁻¹²⁸⁹ の 2.9Å 結晶構造

(4) T4 ファージ gp34C 末端欠失変異体の発現・単離精製・結晶化

gp34N 末端欠失変異体の構造解析は成功したが、N 末端側の構造は未知であり構造解析を行うため、gp34 C 末端欠失変異体の発現系を作成し、gp57A と共発現した。gp34 C 末端欠失変異体は可溶性蛋白質として発現したものの、精製過程で短い断片に分解されることや、ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出位置から、3 量体にフォールドしていないことが示唆された。そこで、上記 gp34C⁷²⁶⁻¹²⁸⁹ の構造から見いだされたリピート配列の最も N 末端に近い部分の 3 ヘリックスバンドル部分に、T4 ファージ wac 蛋白質の 3 量体促進ドメインを導入した gp34N¹⁻⁴⁷³-foldon の発現系を作成し、gp57A と共発現した。これを、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で精製したところ、SDS-PAGE でほぼ単一のバンドになるまで精製できた。ゲル濾過クロマトグラフィーならびに超遠心分析の結果から 3 量体構造を保持していることが分かった。この精製標品に対し結晶化スクリーニングを行ったが、構造解析に適した結晶はいまだ得られていない。

(5) PP01 ファージ、レセプター結合蛋白質 gp38 の発現・単離精製・結晶化

PP01 ファージのレセプター結合蛋白質 gp38 の大量発現系を作成し、発現実験を行ったところ不溶性蛋白質として発現していることが分かった。不溶性画分からの可溶化も試みたが、安定な可溶性蛋白質として単離精製することはできなかった。そこで、遠位尾繊維蛋白質 gp37 の C 末端とシャペロン蛋白質 gp57A と共発現することで、可溶性蛋白質複合体(gp37C)3-gp38 として発現した。この複合体を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で精製した。この精製標品に対し結晶化スクリーニングを行ったが、構造解析に適した結晶はいまだ得られていない。そこで、この精製標品をトリプシンで処理したところ、可溶性の gp38C 末端断片が得られた。この断片は、レセプター結合ドメインであると考えられたため、この

gp38C 末端断片単独の発現系を作成したところ、可溶性蛋白質として発現した。これを、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で精製したところ、SDS-PAGE でほぼ単一のバンドになるまで精製できた。この精製標品に対し結晶化スクリーニングを行ったが、構造解析に適した結晶はいまだ得られていない。

(6) バクテリアの VgrG 蛋白質 C 末端ドメインの結晶構造解析

大腸菌 O157 VgrG 蛋白質の C 末端ドメイン VgrG1⁴⁶⁷ の大量発現系を用いて、可溶性蛋白質として発現し、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で精製した。さらに、この精製標品をトリプシンで処理して得られた C 末端フラグメント VgrG1⁵⁶¹ に対し結晶化スクリーニングを行い、構造解析に適した結晶が得られた。さらに、セレンメチオニン置換体の結晶も得られ Swiss light source (SLS)にて、X 線回折データを収集し SAD 法により位相決定を行い、1.95Å の結晶構造を決定した (図 2)。その構造は、β プリズムタイプの三角柱構造であり、T4 ファージ gp5 の C 末端にみられる β ヘリックスタイプとは異なった構造であった。この構造をもとに、これまで報告されている β 構造から形成される三角柱構造の配列との相関を明らかにすることができた。

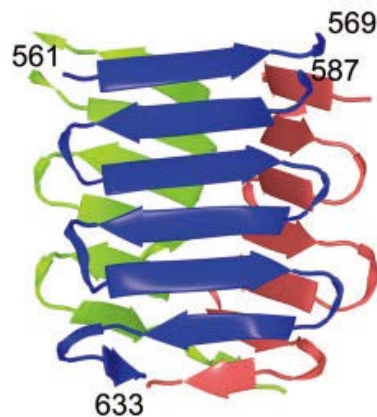


図 2 大腸菌 O157 VgrG1 C⁵⁶¹ の結晶構造

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 6 件)

- ① F. Arisaka, M. L. Yap, S. Kanamaru and M. G. Rossmann, Molecular assembly and structure of the bacteriophage T4 tail. Biophys Rev 2016, 8, (4), 385-396., doi10.1007/s12551-016-0230-x (査読有)

- ② T. Arai, S. Kimata, D. Mochizuki, K. Hara, T. Zako, M. Odaka, M. Yohda, F. Arisaka, S. Kanamaru, T. Matsumoto, S. Yajima, J. Sato, S. Kawasaki and Y. Niimura, NADH oxidase and alkyl hydroperoxide reductase subunit C (peroxiredoxin) from *Amphibacillus xylanus* form an oligomeric assembly. *FEBS Open Bio* 2015, 5, 124-31., doi10.1016/j.fob.2015.01.005 (査読有)
- ③ K. Uchida, P. G. Leiman, F. Arisaka and S. Kanamaru, Structure and properties of the C-terminal beta-helical domain of VgrG protein from *Escherichia coli* O157. *J Biochem* 2014, 155, (3), 173-82., doi10.1093/jb/mvt109 (査読有)
- ④ T. Iwura, J. Fukuda, K. Yamazaki, S. Kanamaru and F. Arisaka, Intermolecular interactions and conformation of antibody dimers present in IgG1 biopharmaceuticals. *J Biochem* 2014, 155, (1), 63-71., doi10.1093/jb/mvt095 (査読有)
- ⑤ M. Granell, M. Namura, S. Alvira, C. Garcia-Doval, A. K. Singh, I. Gutsche, M. J. van Raaij and S. Kanamaru, Crystallization of the carboxy-terminal region of the bacteriophage T4 proximal long tail fibre protein gp34. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 2014, 70, (Pt 7), 970-5., doi10.1107/S2053230X14010449 (査読有)
- ⑥ F. Arisaka and S. Kanamaru, Protein interactions in the assembly of the tail of bacteriophage T4. *Biophys Rev* 2013, 5, (2), 79-84., doi10.1007/s12551-013-0114-2 (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① Kazuya Uchida, Shuji Kanamaru, Petr Leiman, Fumio Arisaka, Crystal structure of the C-terminal domain of VgrG1 protein of *E. coli* O-157 Type 6 secretion system. 第 51 回日本生物物理学会年会 2013.10.28-30 国立京都国際会館 (京都)
- ② Meritxell Granell, Mikiyoshi Namura, Sara Alvira-de Celis, Carmela Garcia-Doval, Abhimanyu K Singh, Mark J. van Raaij, Fumio Arisaka, Shuji Kanamaru, The crystal structure and the stability of C-terminal fragment of gp34, proximal half of long tail fiber of bacteriophage T4. XIII

Biennial Conference on Phage/Virus Assembly 2013.9.8-13 Lake Arrowhead, CA (USA)

- ③ Shuji Kanamaru, Mikiyoshi Namura, Fumio Arisaka T4 ファージ gp34C 末端側半分の結晶構造から得られたファージ尾繊維に共通の構造. 第 51 回日本生物物理学会年会 2013.10.28-30 国立京都国際会館 (京都)
- ④ Takafumi Iura, Jun Fukuda, Katsuyoshi Yamazaki, Shuji Kanamaru, Fumio Arisaka Intermolecular interactions and conformation of antibody dimers present in IgG1 biopharmaceuticals. 第 51 回日本生物物理学会年会 2013.10.28-30 国立京都国際会館 (京都)
- ⑤ 金丸周司、伊藤悠太、有坂文雄, Structure and function of holin and anti-holin of bacteriophage T4. 第 13 回蛋白質科学会年会 2013.6.12-14 とりぎん文化会館(鳥取市)
- ⑥ Fumio Arisaka, Kaname Nishijo, Yasunori Tanji, Shuji Kanamaru, Proteolytic processing of gp37 and the stoichiometry of gp37-gp38 receptor binding complex from T2-like phage PP01. The 4th APPA Conference 2014.5.17-20 International Convention Center (Jeju, Korea)
- ⑦ Shuji Kanamaru, Kazuya Uchida, Takahiro Momiyama, Kaname Nishijo, Fumio Arisaka, T4 型ファージと T2 型ファージの尾繊維先端受容体結合蛋白質の構造と機能. 第 52 回日本生物物理学会年会 2014.9.25-27 札幌コンベンションセンター
- ⑧ 金丸周司、西條要、有坂文雄, T2 類縁ファージの宿主認識蛋白質複合体の発現精製と性状解析. 第 14 回蛋白質科学会年会 2014.6.25-27 ワークピア横浜 (横浜)
- ⑨ Shuji Kanamaru, Kaname Nishijo, Fumio Arisaka, Stoichiometry and maturation of tail fiber tip host recognition complex of T2 type phage. XXIV Biennial Conference on Phage/Virus Assembly 2015.6.7-12 Les Diablerets (Switzerland)
- ⑩ 有坂文雄、金丸周司, バクテリオファージの構造形成を支える蛋白質. 第 15 回蛋白質科学会年会 2015.6.24-26 あわぎんホール(徳島)
- ⑪ 金丸周司、西條要、有坂文雄, T4 ファージ近位尾繊維蛋白質 (gp34)C 末端, gp34C745-1289 の結晶構造と尾繊維蛋白質複合体の発現. 第 16 回蛋白質科学会年会 2016.6.7-9 福岡国際会議場 (福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金丸 周司 (KANAMARU, Shuji)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：50376951