



Title	Crystal structure of the C-terminal domain of Mu phage central spike
Author(s)	原田, 健一
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60116
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【18】			
氏 名	はら だ けん いち	原 田 健 一	
博士の専攻分野の名称	博 士 (理学)		
学 位 記 番 号	第 2 5 7 2 0 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 12 月 19 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
	理学研究科生物科学専攻		
学 位 論 文 名	Crystal structure of the C-terminal domain of Mu phage central spike		
	(ミューファージのセントラルスパイクの C 末ドメインの結晶構造解析)		
論 文 審 査 委 員	(主査)		
	教 授 中川 敦史		
	(副査)		
	教 授 福山 恵一 教 授 栗栖 源嗣		

論 文 内 容 の 要 旨

Mu ファージは、大腸菌 K12 株やある種の赤痢菌など幅広い種類のバクテリアを宿主とするテンプレートファージである。本ファージは、線状二本鎖 DNA を含む頭部、収縮性の尾部、ベースプレートから成る。多くのテンプレートファージが、座位特異的な溶原化を示すのに対し、Mu ファージは、ホスト染色体上のいずれの座位にもほとんどランダムに溶原化するという特徴をもつ。

ベースプレートは主として、宿主への感染に関わるタンパク質；テールファイバー、テールスパイク、cell-puncturing device から成る。テールファイバーは宿主の選択、テールスパイクは細胞膜への結合、cell-puncturing device は細胞膜貫通の役割を担っている。

最も良く研究されているファージの一つである T4 において、cell-puncturing device は三成分から成ることが報告されている。内二成分の構造が明らかにされたが、cell-puncturing device の先端部は同定されていない。しかし 2012 年に P2 ファージおよび phi92 ファージの cell-puncturing device の先端部分のタンパク質 P2 gpV および phi92 gp138 の構造が明らかになり、セントラルスパイクと名付けられた。

Mu ファージの gene product 45 (gp45)は全 197 アミノ酸残基であり、ベースプレートの構成成分である。その C 末 domain は、P2 ファージの gpV と 45%の相同性を持ち、水晶発振子微量天秤による大腸菌細胞膜との結合が確認されている。本研究の目的は、Mu gp45 の X 線構造解析による、Mu ファージの感染メカニズムの解明である。

Mu gp45 の C 末端ドメインを大腸菌発現系から得て、精製・結晶化を行った。SPRing-8 の BL44XU ビームラインで回折実験を行った。空間群が $P2_1$ 、格子定数が $a = 40.4 \text{ \AA}$, $b = 152.4 \text{ \AA}$, $c = 53.0 \text{ \AA}$, $\beta = 91.0^\circ$ 、分解能が $1.44 \text{ \AA}$ の回折強度データを収集した。位相決定には、白金による重原子置換体を用い、多重波長異常分散(MAD)法で行った。構造精密化の結果、 $R_{\text{factor}} = 0.147$ 、 $R_{\text{free}} = 0.197$ の構造を得た。

非対称単位中に 2 個の三量体が含まれていた。三量体はピラミッド型を形成しており、 β シート、 β ヘリックス、イオン結合領域の三部分に分けられる。その構造は、P2 ファージの gpV の C 末ドメインと良く類似していた。P2 gpV のイオン結合領域には鉄イオン、クロライドイオン、カルシウム

イオンが含まれており、Mu gp45 にも同様の電子密度が観測された。SPring-8 の BL44XU ビームラインで、1.7400 Å および 1.7500 Å の二波長での異常散乱データを収集し、鉄イオンを同定できた。

本研究により Mu gp45 はセントラルスパイクであることが同定できた。Mu gp45 はピラミッド型で、内部に含まれるイオンによってその構造を安定化されていた。これは宿主の膜に突き刺さるのに非常に適した形であった。

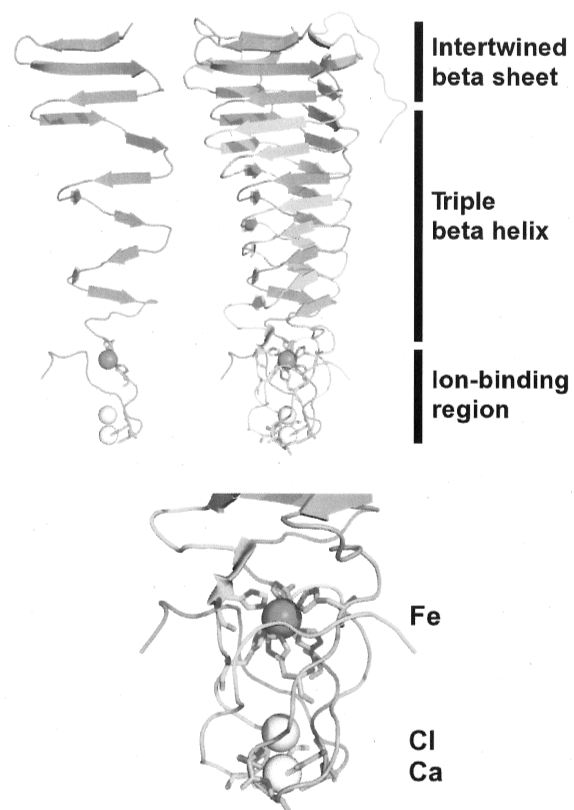


図1 Mu gp45 の C 末ドメインの結晶構造。下はイオン結合領域の拡大図。

論文審査の結果の要旨

ミオウイルス科に属する Mu ファージは、大腸菌 K12 株、シトロバクター、赤痢菌など、幅広い種類のバクテリアを宿主とするテンプレートファージである。多くのテンプレートファージが座位特異的な溶原化を示すのに対し、Mu ファージは宿主染色体上のいずれの座位にもほとんどランダムに溶原化するという特徴をもつ。

Mu ファージは、線状二本鎖 DNA を含む頭部、収縮性の尾部、ベースプレートからできている。ベースプレートは宿主の認識・感染に重要な役割を担っており、宿主の選択に関与するテールファイバー、細胞膜への結合に関与するテールスパイク、細胞膜の貫通に関与するセントラルスパイクから構成されている。

本研究では、P2 ファージのセントラルスパイクを構成する蛋白質 gpV と 33% の配列相同性を持つ蛋白質 gene product 45 (gp45) の構造・機能解明を目指し X 線結晶構造解析法を用いて、gp45 の C 末ドメインの立体構造決定を行った。

N 末端の 99 残基を欠損させた変異体 (gp45 Δ1-99) については、白金誘導体を用いた多波長異常分散法により 1.75Å 分解能で、N 末端の 91 残基を欠損させた変異体 (gp45 Δ1-91) については、gp45 Δ1-99 をサーチモデルとした分子置換により 1.44Å 分解能で、原子構造を決定した。

gp45 は β ヘリックスを基本とした三量体からなる針状構造をとっており、これは P2 gpV の C 末ドメインと良く似た構造であった。このことから、gp45 は Mu ファージのセントラルスパイクを形成すると結論づけた。さらに、C 末ドメインは針状構造を形成する β ヘリックス領域に加えて、3 個の金属イオンを結合した Apex 領域を持ち、このうちの 1 箇所については、鉄の異常分散効果を利用することで鉄イオンと同定し、その他の 2 箇所については、P3 ファージの gpV との比較から、塩素イオン、カルシウムイオンであると同定した。さらに、変異体実験により、これらのイオンがセントラルスパイクの先端領域の構造の安定化に重要であることを示し、この安定性が、宿主への感染時に宿主の細胞膜に穴をあけるために重要な機能であると結論づけた。この成果は、Mu ファージの宿主感染機構を理解する上で重要な知見である。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。