OUKA
Osaka University Knowledge Archive

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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	原田健一（はらだけんいち）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第　25720　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ペ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。多くのテンペレートファージが、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しう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%の相同性をもち、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$a = 40.4$ Å, $b = 152.4$ Å, $c = 53.0$ Å, $\beta = 91.0$ °、分解能が1.44 Å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，$R_{\mathrm{factor}} = 0.147$、$R_{\mathrm{free}} = 0.197$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。

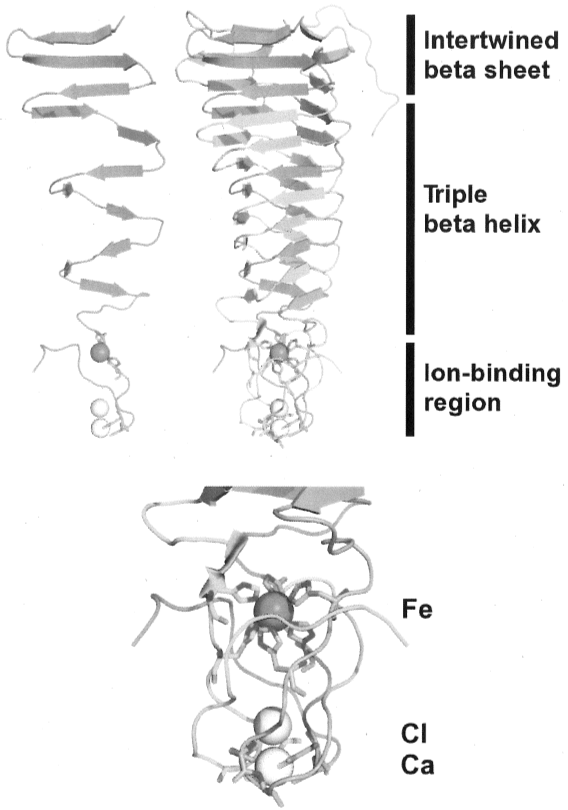

図1　Mu gp45のC末ドメインの結晶構造。下はイオン結合領域の拡大図。

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ペレートファージである。多くのテンペ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しう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、細胞膜への結合人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gvV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。