

学 位 論 文 の 要 旨

バクテリオファージ Mu のサブユニットの構造解析と 結合サブユニットの同定

(Structural analysis of bacteriophage Mu subunits and
identification of their bound subunits)

氏 名 岩崎 拓真 印

バクテリオファージ (ファージ) は細菌に感染するウイルスである。テイルと呼ばれる感染装置を持つファージは、テイルのほかにゲノム DNA を格納するヘッドと宿主細菌を特異的に認識するテイルファイバーを持つ。ヘッドとテイルは、ネックと呼ばれるサブユニットがリング状に重合した短い筒状の構造で連結されている。テイルをもつファージは、収縮可能な長いテイルを持つ *Myoviridae*、非収縮性の長いテイルを持つ *Siphoviridae*、非収縮性の短いテイルを持つ *Podoviridae* の 3 つの Family に分類される。3 つの Family に属するファージは全体構造が大きく異なる一方で、サブユニットの単位では構造に相同性が見られる例が報告されている。第一章では、こうしたファージ研究の背景について解説した。

第二章では *Myoviridae* の一種である Mu ファージについて、ネックサブユニットにも Family 間の立体構造上の相同性があるかどうかを検討するために、Mu ファージのネックのサブユニットであると考えられる Mu gp36 の立体構造の決定を行った。Mu gp36 は C 末端にヒスチジンタグを融合させた組換え体タンパク質として大腸菌を用いて大量発現させ、Ni-NTA カラムとゲル濾過カラムを用いて単離精製した。溶液中でも結晶中でも Mu gp36 は単量体であり、X 線結晶構造解析によって決定された Mu gp36 の立体構造は 5 本の α -Helix からなる球状タンパク質であった。ただし、C 末端側の 33 残基は電子密度が観察されず構造は決定できなかった。決定した Mu gp36 の立体構造を用いて立体構造の相同性検索を行うと、Mu gp36 が HK97 ファージのネックサブユニット gp6、SPP1 ファージのネックサブユニット gp15、P22 ファージのネックサブユニット gp4 と相同であることがわかった。Mu ファージは *Myoviridae*、HK97 ファージと SPP1 ファージは *Siphoviridae*、P22 ファージは *Podoviridae* に分類されることから、3 つの Family に属するファージの間でネックサブユニットにも構造上の共通性がある例があることがわかった。Mu gp36 は単量体であったが、相同な HK97 gp6 と P22 gp4 はともにリング状に重合することが知られていたため、Mu gp36 もファージ粒子中ではリング状に重合していると考えられた。さらに P22 gp4 との比較から、Mu gp36 は C 末端の構造未決定の 33 残基が Mu gp29 の 12 量体と相互作用してリング状に重合することが予想された。

第三章では、Mu gp36 以外の Mu ファージのネックサブユニットである gp29、gp35、gp37、gp38 も gp36 と同様に単離精製し結晶化を試みた。それぞれのサブユニットは電気

泳動的に単一の標品として精製できたものの、ゲルろ過による解析ではいくつかのサブユニットは会合体や凝集体を形成しやすい性質が示唆された。数々の条件検討にも関わらずこれらのサブユニットの結晶は得られなかったことが、こうしたサブユニットの凝集しやすい不安定性が結晶化を阻んでいる問題であると考えられた。

第四章においてこれらのサブユニットからなる中間体複合体の形成によるネックサブユニットの安定化を試みた。安定な中間体を形成する方法として、それぞれのサブユニットの発現菌同士を混合して精製する方法と、共発現ベクターを利用した方法の 2 つを試した。両方の方法で **Mu gp35** と **Mu gp36** が結合して中間体を形成することが確認でき、さらに **Mu gp36** の立体構造と合わせて **Mu** フェージのネック領域におけるサブユニットの配置についての予想図を作成した。

第五章では共発現系の利用が中間体複合体の形成に有効であることが示されたことから、同様の方法をテイルファイバーの精製にも応用した。**Mu** フェージのサブユニットのうち正確なフォールディングにシャペロンが必要であるテイルファイバー **gp49** と **gp52** について、それぞれのシャペロン **gp50**、**gp51** との中間体複合体の形成を試みた。テイルファイバー **gp49** と **gp52** は単独で発現させると沈殿として回収されたが、共発現系で中間体を形成させることにより **Mu gp49** と **Mu gp50** が結合した中間体と、**Mu 52** と **Mu 51** が結合した中間体が可溶性で得られ、それぞれを単離精製することができた。精製した **Mu gp49** と **Mu gp50** が結合した中間体は大腸菌のリポポリサッカライドと結合する活性を保持していた。これらの結果から、共発現系が安定な中間体の形成に有効であることを実証した。

学 位 論 文 の 要 旨

バクテリオファージ **Mu** のサブユニットの構造解析と 結合サブユニットの同定

(Structural analysis of bacteriophage **Mu** subunits and
identification of their bound subunits)

Iwazaki Takuma 印

Bacteriophages (phages) are viruses that infect bacteria. Many phages have a head that stores genomic DNA, an infection device that called a tail, and a tail fiber that recognizes host bacteria specifically. The head and tail are connected by a neck that has short cylindrical structure made from a few subunits polymerized in a ring structure. Tailed phages are classified into three families: *Myoviridae* with a long contractible tail, *Siphoviridae* with a non-shrinkable long tail, and *Podoviridae* with a non-shrinkable short tail. Although the three families have greatly differed overall structure, there are a few examples that show each subunit has structural homology between these three families. Chapter 1 describes the background of such phage researches.

Bacteriophage **Mu** belongs to *Myoviridae* and **Mu gp36** is considered to be one of the neck subunits. In Chapter 2, the three-dimensional structure of **Mu gp36** was determined in order to investigate whether the neck subunit also had a structural homology between the families. Recombinant **Mu gp36** having a histidine tag at its C-terminus was expressed using *Escherichia coli* and purified using a Ni-NTA column and a gel filtration column. **Mu gp36** was a monomer in both solution and crystal. The three-dimensional structure of **Mu gp36** determined by X-ray crystallization was a globular protein consisting of five α -Helixes. The electron density was not observed for 33 residues on the C-terminal. Using the determined structure of **Mu gp36**, a structural homology search was done and revealed that **Mu gp36** was homologous to HK97 phage gp6 neck subunit, SPP1 phage gp15, and P22 phage gp4. Since **Mu** phage is classified as *Myoviridae*, HK97 and SPP1 are *Siphoviridae*, and P22 is *Podoviridae*, our results showed that neck subunit had structural commonality among the three Family phages. In addition, **Mu gp36** was expected to be polymerized in a ring shape in the phage particle,

since homologous HK97 gp6 and P22 gp4 were known to construct in a ring shape. From the analogy with P22 gp4, it was also predicted that Mu gp36 was polymerized in a ring shape by interacting with the Mu gp29 12-mer at 33 residues of the Mu gp36 C-terminus of which structure was not determined

In Chapter 3, the other Mu phages neck subunits: gp29, gp35, gp37, and gp38, were purified in the same manner as gp36 to try crystallization. Although each subunit was surely purified, gel filtration analysis suggested that some of the subunits tended to form oligomers and/or aggregates. This tendency to form aggregates could affect crystallization conditions and was considered to have prevented crystallization.

In Chapter 4, we attempted to stabilize the neck subunit by forming an intermediate complex consisting of these subunits. As a method for forming a stable intermediate, two methods, a method of mixing and purifying bacteria expressing each subunit and a method using a co-expression vector, were tried. By both methods, it was confirmed that Mu gp35 and Mu gp36 bind to each other to form an intermediate, and together with the three-dimensional structure of Mu gp36, a predicted diagram of the arrangement of subunits in the neck region of Mu phage was prepared.

Since Chapter 4 showed the usefulness of the co-expression system for the formation of an intermediate complex, the same method was also applied to tail fiber purification in Chapter 5. Mu tail fiber subunits: gp49 and gp52, require chaperones for correct folding. We attempted to form intermediate complexes with their chaperones: gp50 and gp51, respectively. When tail fibers gp49 and gp52 were expressed alone, they were recovered as precipitates. But by forming intermediates using the co-expression system, we observed an intermediate consist of Mu gp49 and Mu gp50, and an intermediate consist of Mu 52 and Mu 51. The intermediate complex was soluble and successfully purified. Moreover, the purified Mu gp49 and Mu gp50 complex retained the binding activity to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. These results also demonstrated that the co-expression system was effective for the formation of stable intermediates.