

バクテリオファージが生産する細胞毒性酵素の無細胞合成と機能解析

日本大学 工学部 物質化学工学科 平野 展孝

1. 背景・目的

1-1. バクテリオファージを取り巻く状況

細菌に感染し溶菌するウイルス（バクテリオファージ）は、1915年の発見当初、細菌感染症への特效薬としての応用が期待されたが、1929年にペニシリンが発見されて以降、その座は抗生物質に取って代わられた。その後、バクテリオファージは T4 ファージに代表される様に、分子生物学の勃興期における研究対象として、その発展に貢献してきた。しかし近年、抗生物質の効かない薬剤耐性菌が急速に増加しつつあることから、バクテリオファージを用いる医療法（ファージセラピー）、並びに抗菌剤などが再び脚光を浴びるようになってきている。実際、食品に直接スプレーして使用する抗リステリア菌バクテリオファージが、2006年に FDA（アメリカ食品医薬品局）によって食品添加物として認可されたことは記憶に新しい。この様な社会的情勢から、バクテリオファージの感染機構、並びに宿主生育阻害に関与するバクテリオファージの細胞毒性蛋白質/酵素群の解析は、今後、難治性細菌感染症の治療法の開発、或いは食中毒原因細菌に特異的な抗菌剤の開発など、医療・食品分野等において益々重要になってくると予想される。

1-2. 宿主生育阻害に関わる T4 ファージの細胞毒性酵素の解析

溶菌性の大腸菌ファージである T4 ファージ（図 1）は、感染と同時に宿主大腸菌の生命維持機構を様々な手段で乗っ取り、自己の複製のみを可能とする。この際、感染初期に宿主ゲノムの複製をシャットダウンすることが知られているが、そのシャットダウン機構に関与するファージ蛋白質群の作用機序は、現在においても尚、未知の領域と言える。その理由として、これらのファージ蛋白質群は、ほとんど例外無く、宿主大腸菌に対して極めて強い細胞毒性を示すため、大腸菌生細胞を用いた組み換え蛋白質の生合成・調製が困難であることが挙げられる。この様なシャットダウン機構に関与する T4 ファージ蛋白質の一つとして、*denB* 遺伝子産物エンドヌクレアーゼ IV（Endo IV）が挙げられる。T4 ファージ二本鎖 DNA ゲノムでは、シトシン（C）残基が異常塩基ハイドロキシメチルシトシン（HMC）に置き換えられ、更にグルコシル化されている。T4 Endo IV は、一本鎖 C 含有 DNA を分解する酵素であり、C 含有ゲノムの複製を阻害するため、宿主に対して極めて強い細胞毒性を示す。そこで、T4 ファージが生産する細胞毒性酵素（T4 Endo IV）を、生細胞維持の制約を受けない無細胞蛋白質合成系で調製し、その宿主生育阻害における作用機序の解明を目的とした研究を行った。

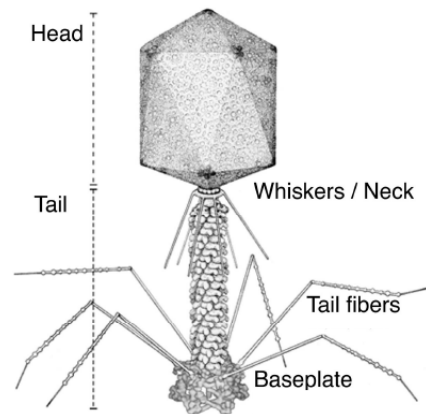


図 1. T4 ファージの構造

Miller, E.S. *et al.*

Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2003) **67**, 86-156.

2. T4 ファージ由来シトシン特異的エンドヌクレアーゼの生化学的・分子遺伝学的解析

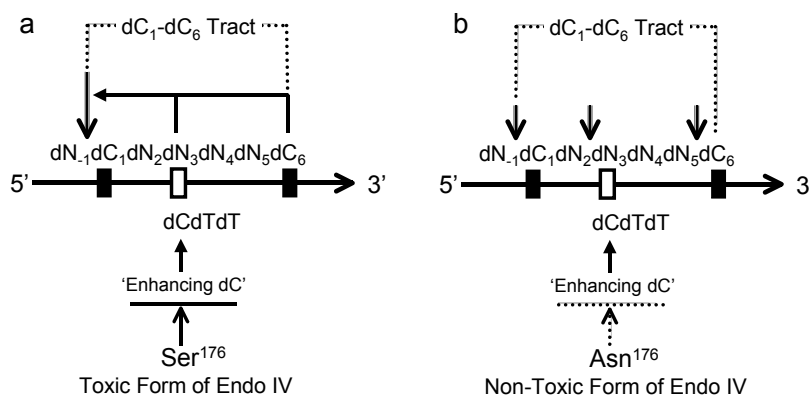
2-1. T4 *denB* 遺伝子産物エンドヌクレアーゼ IV（Endo IV）の無細胞合成と配列認識機構の解析

T4 *denB* 遺伝子産物 Endo IV の宿主大腸菌に対する生育阻害を解析するため、*amber* 変異を導入した *denB* 遺伝子をプラスミドにクローン化し、温度感受性のサプレッサー tRNA を有する大腸菌で発現させることにより、T4 Endo IV が宿主大腸菌に対して極めて強い細胞毒性を示すことを明らかにした (1)。野生型 *denB* 遺伝子は、この極めて強い細胞毒性のため、一般的な大量発現プラスミドにクローン化する

ることが困難である。そこで、生細胞維持に対する制約を受けず、PCR断片から直接的に蛋白質合成が行える小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて、T4 Endo IV の合成、精製を行い、その配列認識機構の解析を行った (1)。その結果、本酵素は一本鎖 DNA 上の C 残基の 5'リン酸結合を特異的に切断し、5'-dC₁dN₂dN₃dN₄dN₅dC₆-3'からなるヘキサマー配列 (dC₁-dC₆) を認識して、その dC₁ 部位を効率良く切断すること、また、dC₁-dC₆ 配列中の 5'-dN₂dN₃dN₄dN₅-3'領域に 5'-dCdTdT-3'配列が存在すると、dC₁ 部位における切断活性が更に上昇することを明らかにした (図 2a) (2)。

2-2. T4 *denB* 遺伝子産物 Endo IV の配列認識-複製阻害の相関

T4 *denB* は、HMC 修飾系を欠損させた C 含有 T4 (T4dC) ファージのゲノム複製、並びにプラスミド形質導入を阻害する。そこで、T4dC ファージのゲノム複製を許容する *denB* 変異のスクリーニングを行い、得られた変異型 *denB* 遺伝子の宿主大腸菌に対する細胞毒性、並びにその変異型酵素の配列認識機構の解析を行った。その結果、T4dC ファージのゲノム複製を許容し、宿主大腸菌に対して全く細胞毒性を示さないにもかかわらず、*in vitro* において野生型酵素の約 20%の酵素活性を有する変異型酵素 S176N (Ser¹⁷⁶→Asn) を分離・同定した。この変異型酵素と野生型酵素の配列認識機構の比較を行った



結果、S176N 酵素は、dC₁-dC₆ 配列中の 5'-dCdTdT-3'配列を認識出来ず、dC₁ 部位における切断特異性を失っていることを明らかにした (図 2b) (3)。これらの結果は、dC₁-dC₆ 配列中の dC₁ 部位を特異的に切断することが、T4 Endo IV の *in vivo* における細胞毒性 (C 含有ゲノムの複製阻害) と密接に関連していることを示唆している。

図 2. T4 Endo IV の野生型酵素 (a) と変異型酵素 S176N (b) の切断様式

以上の研究は、無細胞蛋白質合成を介した生化学的解析と、分子遺伝学的解析の組み合わせが、バクテリオファージの生産する細胞毒性蛋白質/酵素の機能解析に有効な手法であることを示している。

今日、非常によく解析されている T4 ファージでさえ、そのゲノム上に存在する機能未知な遺伝子の多くが、宿主大腸菌に対して細胞毒性を示すことが経験的に知られている。今後、このような手法によって、様々なバクテリオファージの細胞毒性蛋白質/酵素群の宿主生育阻害機構が明らかにされ、医療・食品分野等へ応用されることが期待される。

3. 関連発表論文

1. Biochemical Analysis of the Substrate Specificity and Sequence Preference of Endonuclease IV from Bacteriophage T4, a dC-Specific Endonuclease Implicated in Restriction of dC-Substituted T4 DNA Synthesis.
Hirano, N., Ohshima, H., and Takahashi, H.
Nucleic Acids Research (2006) **34**, 4743-4751.
2. A Hexanucleotide Sequence (dC₁-dC₆ Tract) Restricts the dC-Specific Cleavage of Single-Stranded DNA by Endonuclease IV of Bacteriophage T4.
Ohshima, H., Hirano, N., and Takahashi, H.
Nucleic Acids Research (2007) **35**, 6681-6689.
3. The Ser¹⁷⁶ of T4 Endonuclease IV Is Crucial for the Restricted and Polarized dC-Specific Cleavage of Single-Stranded DNA Implicated in Restriction of dC-Containing DNA in Host *Escherichia coli*.
Hirano, N., Ohshima, H., Sakashita, H., and Takahashi, H.
Nucleic Acids Research (2007) **35**, 6692-6700.