

博士論文

グループ B に属するリボヌクレアーゼコリシンの
構造機能研究

張 榮 維

目次

§ 略号表	1
§ 序章	2
§ 第1章 全長コリシンDの構造解析	
1-1 目的	24
1-2 材料と方法	25
1-3 結果	29
1-4 考察	34
§ 第2章 コリシンD313 (central ドメイン- C 末端 RNase ドメイン) 及び N 末端 translocation ドメインの構造解析	
2-1 目的	36
2-2 材料と方法	37
2-3 結果	41
2-4 考察	55

§ 第3章 コリシン D / tRNA 複合体の X 線結晶構造解析	
3-1 目的	91
3-2 材料と方法	95
3-3 結果および考察	99
§ 第4章 tRNA の切断と細胞死誘導との関係の解析	
4-1 目的	128
4-2 材料と方法	131
4-3 結果	135
4-4 考察	148
§ 総合考察	156
§ References	162
§ 謝辞	171

略号表

NTD	コリシン D の N 末端 translocation ドメイン(アミノ酸 1 - 313 番)
CD	コリシン D の central ドメイン (アミノ酸 314 - 594 番)
CRD	コリシン D の C 末端活性ドメイン (アミノ酸 595 - 697 番)
CoIDXXX	コリシン D のアミノ酸配列 XXX - 697 番の領域
TA システム	トキシン／アンチトキシンシステム
OM	Outer membrane
IM	Inner membrane
PMF	Proton motive force
c.f.u.	Colony forming unit
VBNC	Viable but non-culturable
tmRNA	transfer-messenger RNA

序章

生体内で重要な役割を担うタンパク質の中には、特徴的な構造を持つものがある。これら特徴的な立体構造は生理的および生存戦略に何か特別な意味を持っていると考えられている。そこで、個々の構成要素の性質、その要素と他の要素との関連性、といった従来通りの研究法は、目新しさを失っても、その重要性は更に増大している。生命現象そのものは、構成する因子の様々な特異的相互作用からなるものである。その相互作用の特異性を決定する仕組みを明らかにすることは、生命反応を理解する上で非常に重要である。従って、ゲノム情報の解読から生物を理解しようとする視点では、個々のタンパク質の生体内における作用の解明は、生命科学の根幹を成す重要な課題である。

細胞は生体膜によって外界から遮蔽されており、生体物質やイオンが予想外に拡散するのを防いでいる。一方、生体膜にはチャネルやポンプのような構造およびレセプターなど多くの膜タンパク質が存在し、細胞は環境の変化や代謝反応に応じて物質、エネルギーおよび情報を膜を介して輸送する仕組みを持っている。生体膜を介した物質輸送が生命の維持にとって重要であることが分かっているが、分子量の大きなタンパク質が膜外へ分泌されたり、膜の外から取り込まれたりするタンパク質の膜透過機構については、不明な点が多い。

大腸菌を中心としたバクテリアの研究は、長年の研究成果から多くの実験手法や実験系が利用できること、また生物の中では比較的単純であることなどから、細胞レベルでの生命維持機構を研究するのに、適していると考えられる。

大腸菌も生命の基本原理の解明において、より深いところまで研究が及んでいる点で、今でも非常に良い材料として考えられ、次々と複雑な生命のシステムが明らかになりつつある。

0-1 コリシンについて

バクテリオシンは細菌が生産するタンパク質毒素であり、他の細菌細胞に対抗する手段として利用されている[Riley M.A. et al., 2002]。コリシンはバクテリオシンの一種であり、大腸菌を殺すタンパク質毒素である。多くのコリシンは、大腸菌やその近縁種のもつプラスミドが生産しており、そのようなプラスミドを Col プラスミドと呼ぶ。ColB, Colla, Collb のように接合伝達性のある大型の Col プラスミドと、ColK, ColE1, ColE2, ColE3, ColD のような非伝達性の小型の Col プラスミドがある。伝達性の Col プラスミドは episome 状態を取るので、コリシン生産性が染色体に規定される場合がある。コリシン生産菌は、自身が作ったコリシンによって死なない immunity (免疫性) を示し、各 Col プラスミドはコリシン遺伝子 col とそのコリシンに特異的な免疫性遺伝子 imm を持っている。従って、免疫性が交差する 2 つのコリシンは近縁だと想定されるが同一である保証はない。コリシンの免疫性は、ファージ溶原菌が同種のファージに耐性となる免疫性の、アナロジーとして名付けられた概念であるが、溶原ファージの免疫性は基本的にファージの再感染・増殖を抑制するリプレッサーで説明されるのに対し、コリシンの免疫性はタンパク質毒素としての作用をタンパク質レベルで抑える機構なので、溶原ファージの免疫性とは機構が根本

的に異なる。

抗生物質や他の生物毒素とは異なり、コリシンの抗菌スペクトルは非常に狭く、生産菌と同種、あるいは近縁細菌にのみ作用する[Riley M.A. et al., 2002]。それは、まず、感受性菌の特定の細胞表層タンパク質のレセプターに結合し、その後、特定の侵入経路を経て細胞内の標的部位に向かうというコリシンの特性を反映している。こういう特異性を反映して、コリシンに感受性な大腸菌が非感受性となるケースが 3 つある。①レセプターが変異してコリシンが細胞に吸着できない。②その後の侵入経路が変異して非感受性となる。③Col プラスミドを受容してコリシン生産菌になることによりその免疫性のため非感受性となる。①が原因の非感受性を耐性 (resistance)、②が原因の非感受性を寛容性 (tolerance) として区別することがある。コリシンの分類は、現在では各種の膜変異体を用いて、①、②の違いによる殺菌スペクトルに従って、A, B, C, D…と区分される。次いで、生産菌同士が殺し合うかどうかという③の免疫の特異性により、E1, E2, E3, E4…、あるいは Ia, Ib…等と細分類が進められる。自然から分離された Col プラスミド、あるいはコリシンは、同じ分類のものでも構造と性質が同一とは限らないので、分離株の由来を付記して区別することがある。本論文で対象とした ColD プラスミドは *Escherichia coli* CA23 株由来の ColD-CA23 である。

コリシンは一種のトキシン／アンチトキシンシステム (TA システム) としてプラスミドが獲得した利己的な因子であると考ええることができ、DNA の損傷を伴うような環境変化により惹起される SOS 応答の一つとして発現が誘導さ

れる。TA システムにおいては、トキシンは、通常アンチトキシンにより不活化されているが、栄養飢餓や DNA の損傷など生存が脅かされるような様々なストレスにより活性化され、トキシンを産生する細菌自身の細胞機能を阻害する、あるいは過度の障害を受けた細胞を自殺させることにより、最終的にその TA システムを持った集団にストレスに対する耐性を付与する。ただし、コリシンが他の TA システムと大きく異なる点は、トキシン（コリシン）を細胞外に放出して、TA システム（Col プラスミド）を持たない、あるいは失った（プラスミドを curing した）近親者の生育を積極的に阻害する点である。コリシン生産菌から放出されたコリシンは、感受性大腸菌の細胞表層に存在する特異的な細胞表面レセプター及びインポートシステムを経由して標的菌内へ侵入する[Kim YC et al., 2014]。これらレセプターや透過装置は、本来は、環境からの希少な鉄やビタミンや栄養素の取り込みなど、宿主細胞の機能維持のために存在するものであり、当然ながらコリシンを取り込むために備えているわけではない。すなわち、コリシンは、これらを「乗っ取る」ことで細胞内へと侵入する。

これまで明らかにされたコリシンの活性様式としては、細胞膜にイオンチャネル孔を形成するタイプ、DNase 活性を持つタイプ、RNase 活性を持つタイプ、ペプチドグリカン前駆体であるムレインの合成を阻害するタイプが知られている[Ogawa T et al., 1999] [Masaki H, Ogawa T, 2002] [Papadakos G et al., 2012]。DNase 型および RNase 型コリシンはヌクレアーゼ型コリシンと総称される (Fig. 0-1) 。このうち、RNase 活性を持つコリシンには、16S-rRNA の 3' 末端を切断するコリシン E3、E4、E6、および tRNA のアンチコドンループを切

断するコリシン E5、D が含まれる。

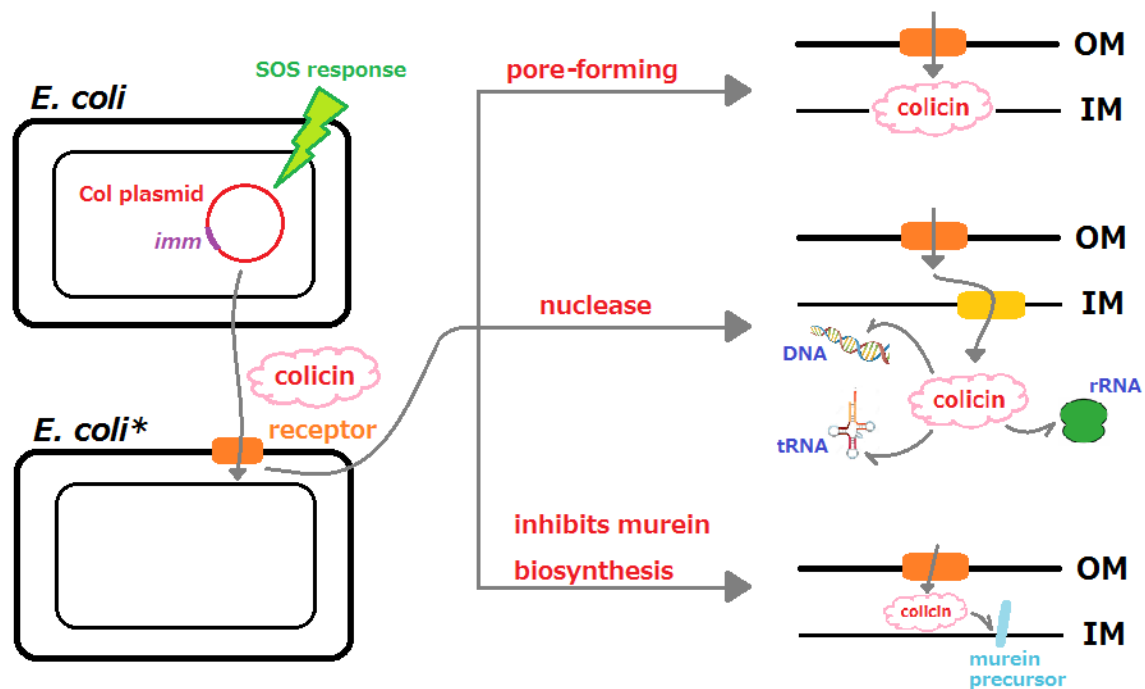


Fig. 0-1 コリシンの発現および作用の模式図

これまで明らかにされたコリシンの活性機構としては、細胞膜にイオンチャネル孔を形成するタイプ、ヌクレアーゼ活性を持つタイプ、ペプチドグリカン前駆体であるムレインの合成を阻害するタイプが知られている。

ヌクレアーゼ型コリシンは、通常は3つのドメインから構成され、これらが主に3つの機能、すなわち、①感受性菌表層レセプターへの結合、②感受性菌細胞膜の透過、③標的因子への作用を担う。ただし、①と②がそれぞれ別のドメインに担われるとも限らない。③の機能を持つドメインは「活性ドメイン」と呼ばれる。ヌクレアーゼ型コリシンのN末端側にはレセプター結合・細胞膜透過に必要なドメインが存在し、C末端領域に活性ドメインが局在している。コリシンプラスミドは、特異的免疫性タンパク質 (Imm タンパク) もコードしており、コリシンは Imm タンパクとの複合体として生産される。これにより、

コリシン生産菌は自らが生産したコリシンによる「自殺」を防いでいる。また、コリシンの非発現誘導時であっても、低レベルで Imm タンパクが発現しており、これにより外部から侵入してきた同種のコリシンから生産菌を保護している。コリシンオペロンの発現は、コリシンプロモーター直下のオペレーター部位 (SOS box) によって制御されている[Kleanthous C et al., 1998]。通常は、LexA が SOS box に結合することで発現が抑制されている。一方で、マイトマイシン C の作用および紫外線照射等の環境ストレスに伴う DNA 傷害により RecA が活性化され、LexA の切断を促進する。この SOS 応答によりコリシンの発現が活性化する。

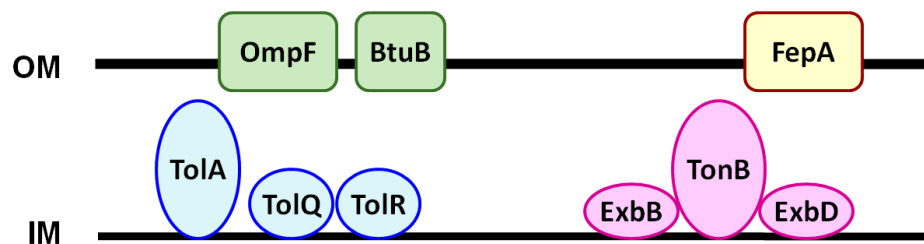
コリシンは、感受性菌への侵入の際に利用するインポートシステムに基づいた分類もなされており、TolA システムを利用するものがグループ A コリシンに、一方 TonB システムを利用するものがグループ B コリシンに含まれる (Table 0-1) [Davies JK, Reeves P, 1975^{a, b}]。これらのインポートシステムの多くは、生理的には鉄等のミネラルやその他の栄養素の取込みに関わるインポートシステムとして機能している。グループ A コリシンは、感受性菌の BtuB (ビタミン B12 の取り込みレセプター) や Tsx (ヌクレオシドの取り込みレセプター) などをレセプターとしてそれらに吸着し、Omp A や OmpF/C を経由して periplasm に侵入した後、TolA システム (TolA/TolQR) によって proton motive force (PMF) 依存的に細胞内の標的に向かう。グループ B コリシンは、感受性菌の FepA、FhuA、Cir などのレセプター (いずれも生理的には鉄の取り込みレセプター) に吸着した後 periplasm へ侵入し、Ton システム (TonB/ExbBD) に

よって PMF 依存的に細胞内の標的に向かう (Fig. 0-2)。本論文で主に注目する
 コリシン D およびコリシン B は、感受性菌の FepA レセプターおよび Ton シス
 テムを経由する点が共通し、グループ B に属する[de Zamaroczy M, Buckingham
 RH, 2002] [Braun V et al., 2002] [Devanathan S, Postle K, 2007] [Mora L et al.,
 2008]。

Table 0-1 既知のコリシンの活性および透過機構

	Group A colicins (ToIA system)	Group B colicins (TonB system)
Pore-forming	A, E1, K, N, S4, U, Y	B , Ia, Ib, V, 5, 10
16S rRNase	E3, E4, E6, DF13	
tRNase	E5	D
DNase	E2, E7, E8, E9	
Inhibits murein biosynthesis		M

For example



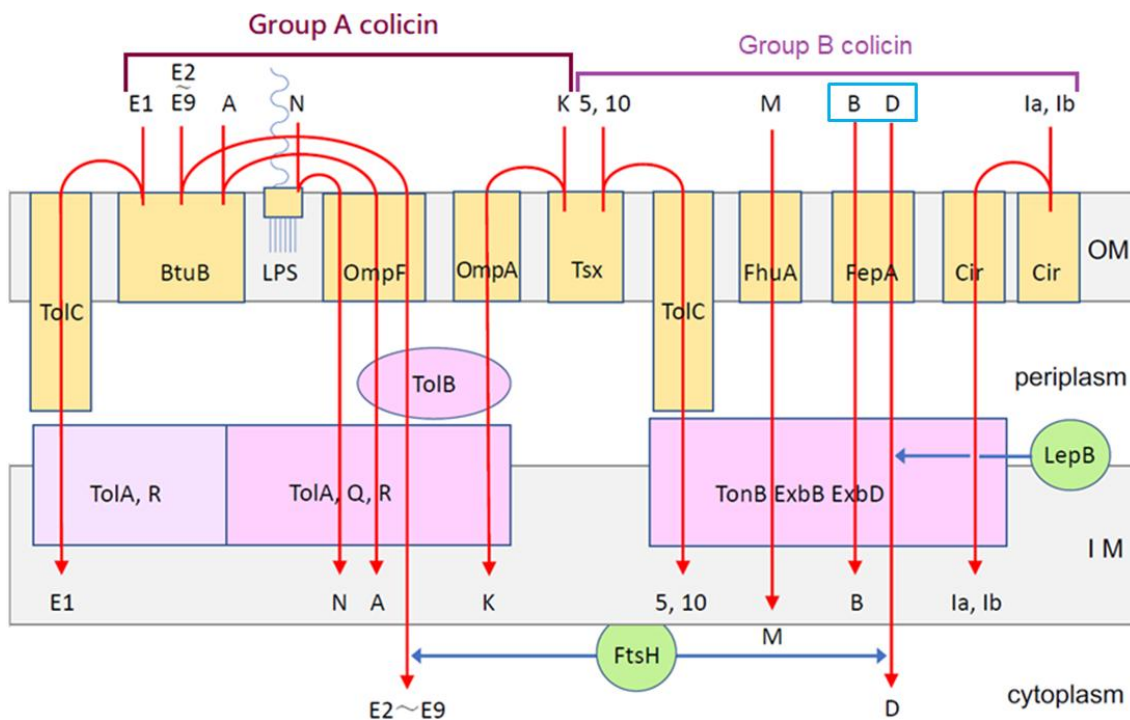


Fig. 0-2 コリシンのインポートシステムの模式図
 OMは outer membrane。 IMは inner membrane。
 正木 春彦 教授より提供された

0-2 コリシンの SOS 発現について

大腸菌が紫外線や放射線照射、或いは DNA 合成阻害や DNA に作用する薬剤の添加などにより DNA が損傷を受けると、LexA という多義的リプレッサーに抑えられていた多数の遺伝子がいっせいに発現し、様々な現象が引き起こされる。その一連の現象を SOS 応答 (SOS response) と呼び、LexA に直接あるいは間接的に制御される遺伝子を SOS 遺伝子、その制御下にあるシステム総体を SOS regulon と呼ぶ。大腸菌細胞は DNA が受けた損傷を修復するため、一時的に DNA 複製や細胞分裂を止め、その間に様々な DNA 修復機能を向上させ、損傷を修復する。また、その修復の過程で相同的組換えや変異の頻度が高くな

り、新しい環境条件に適応した変異体を生む可能性が生まれる。このように SOS 応答は、緊急避難的な対応でありながら、進化の原動力となる積極的な面もある。SOS 応答では、このような大腸菌の生存に関わる遺伝子以外に、溶原性ファージやコリシンといった、大腸菌とは利害の異なる利己的遺伝因子も、緊急事態として発動する。

通常 LexA の抑制を受けている遺伝子のプロモーターには、オペレーターとして LexA の結合部位である SOS box が隣接している。SOS box は LexA が 2 量体をとることを反映して、逆向き反復配列を基本単位としている。DNA 損傷や複製阻害が起ると、修復の過程で細胞中に一本鎖 DNA が蓄積し、RecA タンパク質に結合する。すると RecA が活性化され、LexA レプレッサーに作用してその自己切断反応を引き起す。その結果、細胞内の LexA の有効濃度が減少し、それまで LexA に抑制されていた数十種類の SOS 遺伝子が発現する。*recA* 遺伝子自身が SOS box をもつので、活性化された RecA が増産されるという正のフィードバックが働き、修復や相同的組換えが促進される。

各種の *col* 遺伝子のプロモーターも隣接 3' 側に SOS box を持つので、SOS 誘導処理により LexA レプレッサーの抑制が解除されて大量にコリシンが発現することになる[Ebina, Y., et al., 1981; Ebina, Y., et al., 1983; Masaki, H. & Ohta, T., 1985]。ヌクレアーゼ型コリシンのプラスミドでは、SOS プロモーター下流に *col* 遺伝子、その 3' 側に免疫性 Imm タンパク質をコードする *imm* 遺伝子があり、さらに下流にコリシンの細胞外放出に働く小型のリポタンパク質である *lysis* 遺伝子と転写終結シグナルがあり、そこでオペロンが終わる。Lysis 遺伝子

は高発現させると溶菌を引き起こすが、見かけ上溶菌を引き起こさずにコリシンを分泌する条件もあり、それが生理的機能だと考えられる。*col* と *imm* 遺伝子は近接あるいは部分的に重複して配置しており、*col-imm* 間、あるいは *col* 中に *imm* のプロモーターはなく、translational-coupling により Imm タンパク質がコリシンと同時に誘導発現すると推定される。

コリシン E1 や B のようなイオンチャンネル型コリシンのプラスミドでも SOS オペロンの構造はプロモーターを含めよく似ているが、大きな違いは、これらの *imm* 遺伝子が *col* 遺伝子の 3' 側において SOS オペロンとは逆向きに配置しており、コリシン発現とは連動せず定常的に発現することである。

コリシンの SOS 誘導発現には、紫外線、マイトマイシン C (Mitomycin C, MMC)、Nalidixic acid がよく使われるが、本研究では誘導の程度を調節しやすいマイトマイシン C を 400 $\mu\text{g/L}$ で用いた。マイトマイシンは *Streptomyces caespitosus* の作る抗生物質で、その中で安定性の高いマイトマイシン C は、抗腫瘍性抗生物質として臨床に用いられる[Sugawara R et al., 1956] [Fujimoto Y et al., 1958]。二重鎖 DNA にインターカレートして DNA 複製を阻害し (Fig. 0-3) [Tomasz M, 1995]、がん細胞の分裂を抑制する。

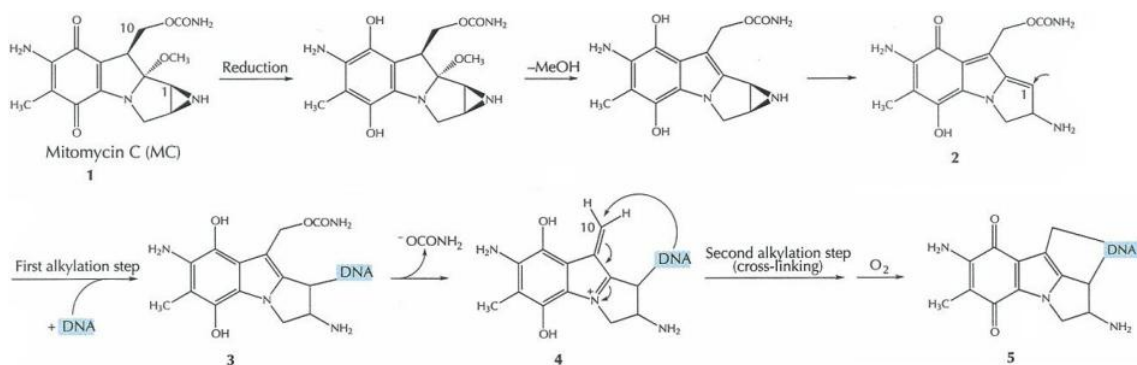


Fig. 0-3 マイトマイシン C の還元活性化反応の模式図 [Tomasz M, 1995]から転載

0-3 コリシン D について

コリシン D は、大腸菌 ColD プラスミドが放出する 697 アミノ酸からなる毒素タンパク質で、他の大腸菌の、鉄の取込みに関わる外膜レセプター FepA に結合し、TonB システム (TonB, ExbB, ExbD) を經由することで細胞内に入り、最終的に C 末端約 100 アミノ酸の RNase ドメイン (C-terminal RNase Domain, CRD) が 4 種の tRNA^{Arg} のアンチコドンループの 3' 末端を切断してタンパク質の翻訳を阻害する [Yajima S et al., 2004] [de Zamaroczy M et al., 2001]。大腸菌 tRNA^{Arg} には 4 種類のアイソアクセプター (tRNA^{Arg}_{ICG}, tRNA^{Arg}_{CCG}, tRNA^{Arg}_{U*CU}, tRNA^{Arg}_{CCU}。I は inosine であり、U* は U の修飾塩基 5-メチルアミノメチルウリジンである) が存在し、コリシン D はこれら 4 種類の tRNA^{Arg} を全て切断できる (Fig. 0-4)。

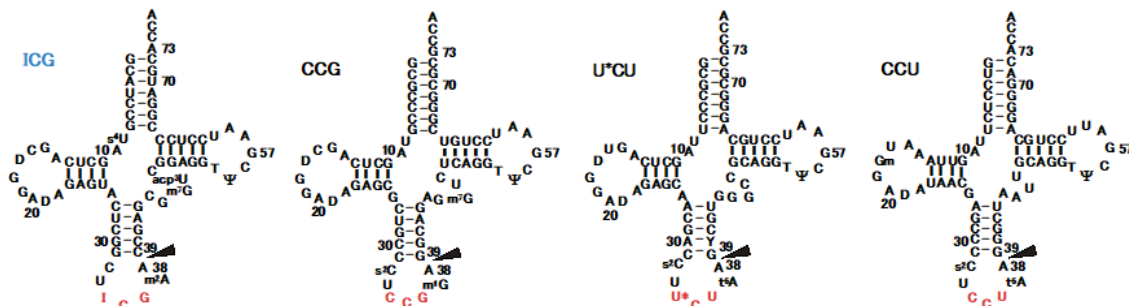


Fig. 0-4 コリシン D が切断する大腸菌 tRNA^{Arg}

コリシン D は、大腸菌に存在する 4 種類の tRNA^{Arg} を全て 38-39 位間で切断する。これら tRNA^{Arg} のうち、アンチコドンに ICG を持つものが細胞内で最も多く存在し、かつコリシン D により最も効率よく切断される。

I は inosine を、U* は 5-メチルアミノメチルウリジンを、Ψ はシュードウリジンを、D はジヒドロウリジンを、T はリボチミジンを表す。

更に、細胞内存在量が最も多い tRNA^{Arg}_{ICG} が、コリシン D により切断感受性が最も高いことが分かった。また、大腸菌が持つ全ての tRNA^{Arg} のアイソアクセプ

ター (tRNA^{Arg}_{ICG}, tRNA^{Arg}_{CCG}, tRNA^{Arg}_{U⁺CU}, tRNA^{Arg}_{CCU}) を、*in vitro* でコリシン D と反応させ、切断部位を調べたところ、すべて tRNA の共通残基番号で 38 番目と 39 番目の間で切断されることが分かった[Tomita K et al., 2000]。また、切断末端としては、2' , 3' -環状リン酸と 5' -OH を生じる。従って RNA の切断は転移反応によるものであり、加水分解反応によるものではない。

第 2 章に詳しく述べるが、コリシン D は N 末端ドメイン(NTD、配列 1 - 313)、central ドメイン (CD、配列 314 - 594) 、および C 末端 RNase ドメイン (CRD、配列 595 - 697) (Fig. 2-17) から構成される。

コリシン D は生産菌の細胞内で CRD に対する 94 アミノ酸の免疫性 ImmD タンパク質とヘテロダイマーを形成するため、自身の tRNA^{Arg} を切断しない [Yajima S et al., 2004] [Graille M et al., 2004]。また、SOS 応答機能が起動していない時にも、ImmD タンパク質は少量発現している。それは、外部から入ってきた同種のコリシンからの毒性を防ぐためであり [Masaki H et al., 1985] [Masaki H et al., 1985] [Roos U et al., 1989]、これが免疫性の本来の意味である。更に、生産されたコリシン D を菌体外に分泌するために lysis タンパク質をコードする *lys* 遺伝子も存在しており、オペロンを形成している。また、コリシン D によって tRNA^{Arg} が切断された感受性菌はすぐに死ぬわけではなく、静菌的状态に陥ることが分かっている[Sakai F et al., 2015]。

0-4 コリシン B について

コリシン B は、511 アミノ酸からなるイオンチャネル型コリシンである。N

末端ドメイン（1 - 313）は、感受性菌の外膜を通る機能を持つと考えられている。残る C 末端ドメインは感受性菌の内膜に作用すると推定されている。コリシン D と同様、外膜レセプター FepA に結合し、TonB システム（TonB, ExbB, ExbD）を経由することで感受性菌の細胞質に侵入する。コリシン B の構造は 2 つのドメインから構成され、両ドメインは一本のヘリックスで繋がれたダンベル状構造を示す（Fig. 0-5） [Hilsenbeck JL et al.,2004]。

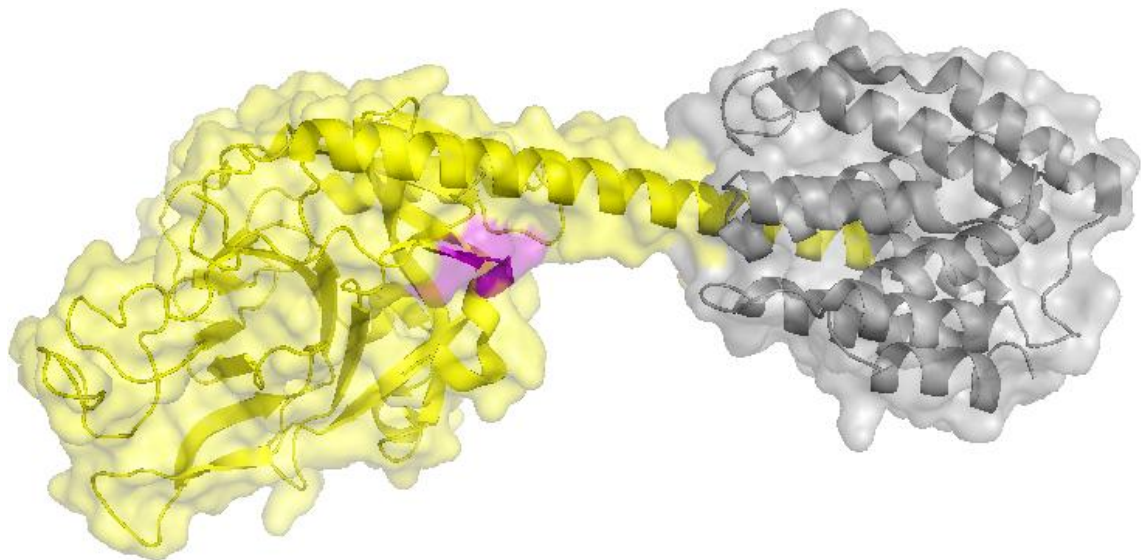


Fig. 0-5 コリシン B の全体構造（PDB ID: 1RH1）

コリシン D と N 末端領域で相同性を示すコリシン B の結晶構造を示した。黄色で示した N 末端領域は、感受性菌の外膜に存在する FepA レセプターへの結合と、それに続く細胞内透過に必要である。灰色で示した C 末端領域は、感受性菌内膜でのチャンネル形成に関わる。紫色で示した領域は TonB box (¹⁷DTMVV²¹) と呼ばれ、感受性菌の内膜にある TonB と結合すると考えられている。

C 末端ドメインは感受性菌の内膜にイオンチャンネルを形成し、膜電位を消失させる機能を持つ。一方、N 末端ドメイン（1 - 313）は、コリシン D の N 末端ドメインと、95.2%のアミノ酸配列同一性があることから、コリシン B の N 末端

の立体構造は、コリシン D のものと高度に一致すると予想された (Fig. 0-6)

(Table 0-2)。

```

B   MSDNEGSVPTEGIDYGDTMVVWPSTGRIPGGDVKPGGSSGLAPSMPPGWDYSPQGIALV 60
D   MSDYEGSGPTEGIDYGHSMVVWPSTGLISGGDVKPGGSSGIAPSMPPGWDYSPQGIALV 60
    *** ** *****.:***** *.*****.:*****

B   QSVLFPGIIRRIILDKELEEGDWSGWSVSVHSPWGNEKVSAAARTVLENGLRGGLPEPSRP 120
D   QSVLFPGIIRRIILDKELEEGDWSGWSVSVHSPWGNEKVSAAARTVLENGLRGGLPEPSRP 120
    *****

B   AAVSFARLEPASGNEQKIIRLMVTQOLEQVTDIPASQLPAAGNNVPVKYRLTDLMQNGTQ 180
D   AAVSFARLEPASGNEQKIIRLMVTQOLEQVTDIPASQLPAAGNNVPVKYRLMDLDMQNGTQ 180
    *****

B   YMAIIGGIPMTVPVVDVAVPVPDRSRPPTNIKDVYSAPVSPNLPDLVLSVGMNTFVRSNP 240
D   YMAIIGGIPMTVPVVDVAVPVPDRSRPPTNIKDVYSAPVSPNLPDLVLSVGMNTFVLSNP 240
    *****

B   EIQEDGVISETGNYVEAGYTMSSNNHDVIVRFPEGSGVSPLYISAVEILDSNLSQRQEA 300
D   EIQEEGVIAETGNYVEAGYTMSSNNHDVIVRFPEGSDVSPLYISTVEILDSNGLSQRQEA 300
    ****.:***.:*****.:*****.:*****.:*****

B   ENNAKDDFRVKKEQENDEKTVLTKTSEVIIISVGDKVG----- 337
D   ENKAKDDFRVKKEEAVARAEAEKAKAELFSKAGVNQPPVYTQEMMERANSVMNEQGALVL 360
    **:*****: . . .:***:..* :

B   -----EYLGDKYKALSREIAENINNFQG----- 360
D   NNTASSVQLAMTGTGVWTAAGDIAGNISKFFSNALEKVTIPEVSPLLMRISLGALWFHSE 420
    * : : :*** **.:* .

B   -----KTIRSYDDAMSSINKLMANPSLK 383
D   EAGAGSDIVPGRNLEAMFSLSAQMLAGQGVVIEPGATSVNLPVRGQLINSNGQLALDLLK 480
    . . . : . * :* **

B   INATDKEAIVNAWKAFNAEDMGNKFAALGKTFKAADYAIKANNIREKSIEGYQTGNWGKPL 443
D   TGNESIPAAVPVLNAVRDTATGLDKITLPAVVGAPSRITLVNVPVQPSVPTDTGNHQVVP 540
    . . * * .:*. . * . :* .. *..:* .* : : * : .:

B   MLEVESWVISGMASAVALSFLSLTLGSALIAFGLSATVVGVFVGVVIAGAIGAFIDDKFVD 503
D   VTPVHTGTVEKSVEMPVTTITPVSDVGGRLDFIYWRPDAAGTGVEAVYVMLNDPLDSGRF 600
    : *. : . . . : : : ..* * . . .** . : : * .

B   ELNHKIIK----- 511
D   SRKQLDKKYKHAGDFGISDTKKNRETLTKFRDAIEEHLSDKDTVEKGTYRREKGSKVYFN 660
    . : : *

B   -----
D   PNTMNVVVIKSNGEFLSGWKINPDADNGRIYLETGEL 697

```

Fig. 0-6 コリシン B およびコリシン D のアミノ酸配列の比較

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment を用い、コリシン B とコリシン D のアミノ酸配列を比較した。

「*」は完全に一致しているアミノ酸配列であり、「:」は強い類似性のあるグループに、「.」は弱い類似性のあるグループに属しているアミノ酸配列である。

Table 0-2 コリシン B およびコリシン D の N 末端領域 (1 - 313) で異なる 15 個のアミノ酸

アミノ酸配列の番号	コリシン B	コリシン D
4	Asn	Tyr
8	Val	Gly
17	Asp	His
18	Thr	Ser
27	Arg	Leu
29	Pro	Ser
41	Leu	Ile
172	Thr	Met
237	Arg	Leu
245	Asp	Glu
249	Ser	Ala
277	Gly	Asp
285	Ala	Thr
293	Ser	Gly
303	Asn	Lys

0-5 コリシン D の最小活性ドメインについて

すでに述べた通り、コリシン D とコリシン B の N 末端領域の間には高い相同性が見られるが、N 末端から 313 番目の Glu 以降の 385 残基からなる領域では、コリシン B との相同性が消失する。この C 末端ドメインに、コリシン B の活性ドメインが存在すると考えられる。石田亘は、コリシン D の活性ドメインの探索を行っていたが、コリシン D の Glu314 以降の領域に注目した[石田亘、修士論文]。そこで、Glu314 以降をコードする遺伝子領域を 5'側から段階的に欠失させ、コリシン E5 の膜透過およびレセプター結合ドメインをコードする遺伝

子領域融合させることで、様々な長さのコリシン D の C 末端領域を持つコリシン E5 とのキメラタンパク質（コリシン E5::D-CRD）を発現するプラスミドを作製した。そして、これらのプラスミドで形質転換した大腸菌より調製したキメラタンパク質の殺菌活性を調べた。

その結果、Asp532 以降 166 アミノ酸残基からなる領域が、全長コリシン D とほぼ同等の殺菌活性を持つことが分かった（レセプター結合と細胞内侵入経路はコリシン E5 のものを使っている）。また、この C 末端 166 アミノ酸領域（以降、ColD532 と呼ぶ）と ImmD との複合体を大腸菌にて発現させ、これらを個々に精製した。この ColD532 は、野生型コリシン D と同等の tRNA^{Arg} 切断活性を有しており、基質特異性も保持されていた。

そこで、高橋一敏は ColD532 と ImmD（精製の目的のために、C 末端に His-tag が付加されている）との共結晶の調製を試みたが、結晶の取得には至らなかった。電気泳動の結果から、コリシン ColD 532 の N 末端側には分解を受けやすい領域が存在することが分かり、これが結晶化を阻害することが考えられた[高橋一敏、博士論文]。

そこで、アミノ酸配列相同性の面からコリシン D の活性ドメインの探索を行った。コリシン D において、コリシン B との相同性が消失する Glu313 以降の領域に、*Pseudomonas aeruginosa* が生産する DNase 型バクテリオシンである pyocinS1, S2 の膜侵入ドメインとアミノ酸配列で約 30%の緩い相同性がみられた。高橋一敏は、この pyocinS1, S2 との相同性がみられなくなる C 末端領域を最小活性ドメインと推定し、Leu595 以降の 103 残基からなるコリシン

ColD595 を大腸菌で発現、精製し、tRNA 切断活性を評価した[高橋一敏、博士論文]。ColD595 は、全長コリシン D とほぼ同等の触媒活性を持ち、また基質特異性も保たれていた。このことから、この ColD595 が最小の活性ドメインであると考えた。そこで、ColD595/ImmD 複合体の共結晶化を行い、立体構造を 2.3 Å の分解能で決定した (Fig. 0-7) [Yajima S et al., 2004]。

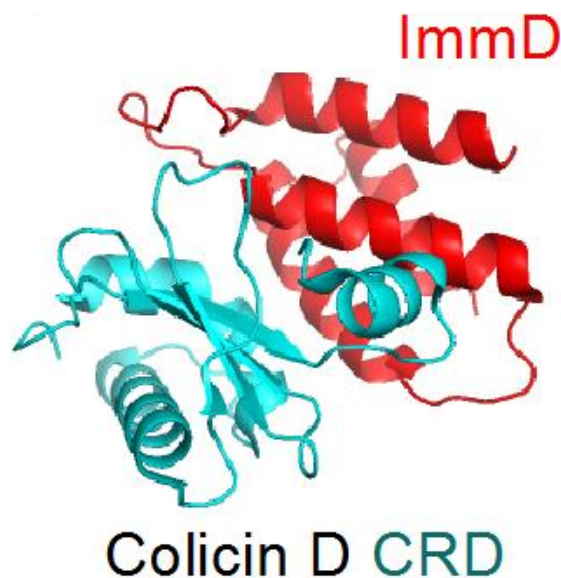


Fig. 0-7 ColD595/ImmD 複合体の結晶構造 (PDB ID: 1TFO)
高橋一敏らにより決定された ColD 595/ImmD 複合体の共結晶構造を示した。
ColD595 をシアンで、ImmD を赤で示した。

0-6 今まで分かっているコリシン D の透過経路について

前述の D-CRD595/ImmD の結晶構造に加えて、Graille らにより 591 番目のアミノ酸残基から始まる領域 (ColD591 と呼ぶ) と ImmD との共結晶構造が決定された[Yajima S et al., 2004] [Graille M et al., 2004]。また、Walker らは、ヌクレアーゼ型コリシンの細胞内透過にはプロテアーゼによる切断が必須であり、これにより C 末端の活性ドメインが感受性菌細胞質内に入ることを示した

[Walker D et al., 2007]。また、Chauleau らは、コリシン D を作用させた感受性菌細胞内では、切断された C 末端領域（590 番目のアミノ酸以降の領域からなる）が検出されることを報告した[Chauleau M et al., 2011]。このことから、コリシン D においても、同様に透過の過程でプロセッシングを受け、C 末端のみが細胞質内へと到達すると考えられた。なお、同グループでは、試験管内調製したコリシン D のアミノ酸 607 番目以降の領域に tRNA 切断活性がみられることから、この ColD607 がコリシン D の最小活性ドメインであると主張した。しかし、石田により大腸菌で発現・精製した D-CRD607 には全く活性がみられなかったことから、コリシン D の最小ドメインについては未だ議論の余地があると考えている。

すでに述べた通り、コリシン D の中央領域には立体構造が決定されていない central ドメイン（CD, アミノ酸 314 - 594 番目）が存在する。また、この CD 領域のうち、アミノ酸 410 - 437 番目の領域は、後述する Type I signal peptidase LepB と相互作用することが報告された[Mora L et al., 2015]。

0-7 FepA について

FepA は 22 本鎖の β -barrel を持ち、その barrel 構造はトンネルに似ている。FepA にはさらに、そのトンネルの穴に栓をするような、プラグドメインと呼ばれる構造が付け加わっている。そのプラグドメインには、TonB box と呼ばれる配列があり、内膜にある TonB システムと相互作用する (Fig. 0-8)[Buchanan S.K et al., 1999]。大腸菌の外膜にある FepA は、生理的には鉄の取り込みに関与す

るキレーターであり、シデロフォア的一种である。Ferric enterochelin（あるいは ferric enterobactin）のレセプターであり、Ton B システムは本来はその enterochelin を FepA から受け取ってエネルギー依存で細胞質内に取り込む機能のあるシステムである[Noinaj N et al., 2010]。

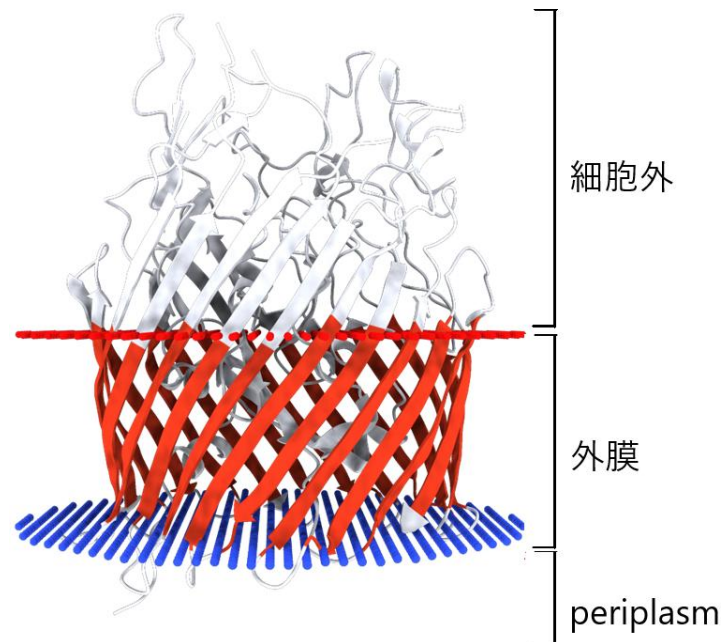


Fig. 0-8 レセプターFepAの構造 (PDB ID: 1FEP)

FepAは22本鎖の β -barrel構造をとり、大腸菌の外膜に挿入された状態で存在する。Barrel構造はトンネルに似ていて、そのトンネルの穴に栓をするような、プラグドメインと呼ばれる構造が付け加わっている。細胞外領域および外膜への挿入領域をそれぞれ白、赤で示した。また、青で示した領域は、periplasm空間に露出している。

[Buchanan SK et al., 1999]

0-8 LepBについて

Type I signal peptidase LepBは大腸菌の内膜に局在し、細胞内局在化を決定するシグナル配列の切断に関わる。LepBは特殊な serine protease であり、分泌性タンパク質および膜タンパク質のN末端に存在するリーダーペプチドを

除去する。LepB の C 末端領域は大腸菌の内膜に挿入されており、また活性中心を含む N 末端ドメインは periplasm に露出している。一例として、大腸菌由来の LepB の結晶構造を示す (PDB ID: 1KN9) (Fig. 0-9)。

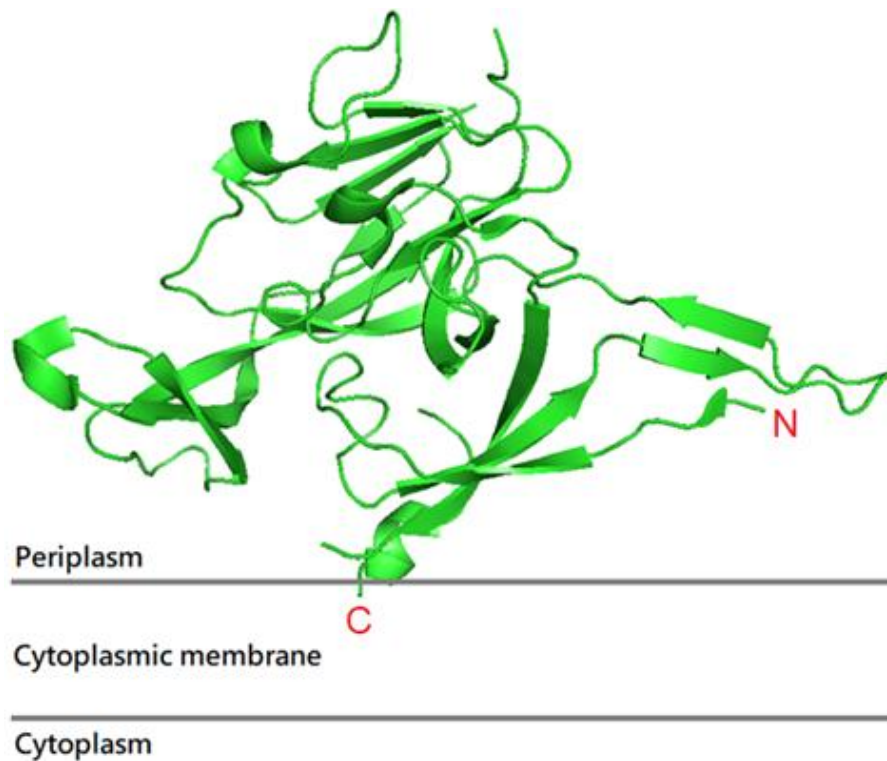


Fig. 0-9 大腸菌 type I signal peptidase LepB の可溶性ドメインに関する結晶構造 (PDB ID: 1KN9)
大腸菌由来の LepB の結晶構造を示した。C 末端領域は大腸菌の内膜に挿入されており、また活性中心を含む N 末端ドメインは periplasm に露出している。

0-9 FtsH について

FtsH は ATP 依存性メタロプロテアーゼであり、損傷を受けたタンパク質のアミノ酸末端を認識し、ATP 依存的にこれを分解する活性を持ち、タンパク質の品質管理に関わると考えられている[Tomoyasu T et al.,1995]。FtsH の ATPase 領域は、AAA family (ATPases Associated to a variety of cellular Activity) と呼

ばれる広く分布する一群の ATPase と相同性を示す[Kunau et al., 1993]。FtsH は細菌のみならず酵母などの真核生物にもみられ、またミトコンドリアや葉緑体などのオルガネラにも存在する。FtsH タンパク質は、生体内では多量体として存在することが示唆されている[Akiyama Y et al.,1995]。また、細菌の FtsH は、barrel-shaped homo-hexamers 構造をとる。大腸菌において FtsH は必須な膜タンパク質であり、lipopolysaccharide の生合成を調節し、またヒートショック反応にも関与する。更に、FtsH はタンパク質のターンオーバーや膜タンパク質の膜への組み込みの際のシャペロンとして機能することも報告されている。

松澤らは、グループ A であるコリシン E2 や E3 と、グループ B であるコリシン D、Ia、Ib の両方に tolerance がある変異株 *tolZ* を取得した[Matsuzawa H et al.,1984]。その後、曲らは、*tolZ* 遺伝子が、細胞分裂に関与する遺伝子である *ftsH* と同一であることを示し[Qu JN et al.,1996]、牧野らは *ftsH* (*tolZ*) 遺伝子の発現が mRNA の二次構造によって制御されることを示した[Makino S et al., 1997]。また、Walker らの研究により、Ton および Tol システムを利用するヌクレアーゼ型コリシンは、FtsH によるタンパク分解機能を「悪用」し、感受性菌の内膜を通過すると考えられている[Walker D et al., 2007]。一方、コリシン D および E3 では、C 末端にある RNase 活性ドメインがプロセッシングを受けて細胞質内へと侵入することを述べたが、この分解に FtsH が関与することが報告されている[Chauleau M et al., 2011]。しかし、これまでコリシン D の全体構造が明らかにされていなかったことから、根拠となる実験は全て生化学的データのみであり、多くの不明点を残していた。

0-10 本研究の目的と構成

第 1 章と第 2 章では、コリシン D の全体構造を決定することで、コリシン D の透過経路および個々のドメインの機能を明らかにすることを目的とした。コリシン D の全体構造が解明されれば、各領域の機能や感受性菌への侵入経路、および役割も推定できると期待された。第 3 章では、コリシン D の tRNA^{Arg} 選択性を構造学的に明らかにするために、コリシン D と tRNA との共結晶構造解析も試みた。第 4 章では、コリシン D による tRNA 切断を介した細胞死誘導機構についても考察した。

第 2 章は、[Chang JW et al., 2018] という報文に、第 4 章の一部は、[Sakai F et al., 2015] という報文にすでに発表してある。

第 1 章 全長コリシン D の構造解析

1-1 目的

矢嶋らおよび Graille らの 2004 年の研究により、細胞質に到達するコリシン D の最小活性ドメインと考えた 595 番からの配列 (D-CRD595) と ImmD と結合した共結晶が得られ、コリシン D の CRD (C-terminal tRNase domain) の構造が解明された[Yajima S et al., 2004] [Graille M et al., 2004]。一方で、同年感受性菌の内膜に穴を開ける活性を持つと推定されているコリシン B の全体構造も解明され[Hilsenbeck JL et al., 2004]、その後コリシン B が感受性菌の外膜を通過するときの侵入経路も明らかにされた[Devanathan S et al., 2007]。コリシン D はグループ B に属し、TonB を利用するが、ヌクレアーゼタイプコリシンであるため、感受性菌の外膜や内膜を通過して細胞質に到達しないと作用できない。しかし、コリシン D の構造で未知な領域はまだ多く、活性ドメイン以外の領域の立体構造については報告されていない。また、現在のモデルでは、コリシン D はどうやって細胞の中に侵入するのか、まだはっきりと示されていない。

そこで、コリシン D を全長で結晶化することにより、コリシン D の全体構造解明を目指した。コリシン D の全体構造が解明されれば、各領域の機能や感受性菌への侵入経路、および役割も解明できると期待した。

1-2 材料と方法

1-2-1 使用菌株とプラスミド

目的蛋白質の発現には、大腸菌 W3110 株を用いた。全長コリシン D/ImmD 複合体を発現するプラスミドを以下の方法で作製した。

pBR328 由来の *ori*, *bla* を持ち、pColE3-CA38 由来の SOS プロモーターに依存して E3-CRD/ImmE3 を発現するプラスミドである pMS301BS (ただし、*colE3* の CRD コード領域の 3' 末端に *NcoI* 部位を導入してある) より、E3-CRD/ImmE3 をコードする *NcoI* - *FbaI* 領域を切り出した。そして、pColD-CA23 (コリシン D, ImmD, lysis 蛋白質をコードする自然分離のプラスミド) を鋳型として 5' 末端に *SphI* サイト (GCATGC) と一つの Arg コドンを含むように (GCATGCGG)、3' 末端に *FbaI* サイト (TGATCA) を導入するように、全長コリシン D/ImmD コード領域を PCR により増幅した。得られた断片を、*SphI* や *FbaI* で切断した後に、pMS301BS の *NcoI* - *FbaI* に導入した。以降、このプラスミドを pDDfull-ColD と呼ぶ。なお用いたプライマーを以下に示した。

SphI-Arg-ColD-Full-Fw:

5' -AAGCATGCGGAGTGATTACGAAGGTAGTGGTCCG-3'

ImmD-(His)₆-*FbaI*-Rv:

5' -TTTGATCACTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTAAATTTAAATTTTTCCAAG-3'

1-2-2 全長コリシン D/ImmD-His 6 複合体の発現

E. coli W3110 [pDDfull-ColD] を、アンピシリンを終濃度で 100 µg/mL に

なるように添加した L-broth (1% Bacto tryptone (Difco), 0.5% Yeast extract (Difco), 0.5% NaCl (国産化学)) 10 mL に植菌し、37°C、16 時間前培養した。5 L のコブ付き三角コルベンを用いて 1 L の L-broth に前培養液 10 mL を植菌し、37°C で振盪培養することで本培養とした。本培養の時に消泡剤を添加した。一定時間ごとに波長 660 nm における濁度を測定し、 $OD_{660} \approx 0.8$ の時にマイトマイシン C を終濃度が 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加え、SOS 誘導をかけた (SOS 誘導の発現効率が良いために用いられた)。その後、37°C、3 時間培養し、遠心 (4°C、9000 rpm、5 分間) により集菌した。

1-2-3 全長コリシン D の精製及び濃縮

集菌した菌体を全体で 30 mL になるように 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0), 300 mM NaCl, 10 mM imidazole に懸濁し、氷冷しながら超音波破砕機により菌体を破砕した。菌体破砕終了後、遠心 (4°C, 15,000rpm, 30 分) により不溶性画分を除去し、上清を回収した。次に、上清を binding buffer (50 mM NaH_2PO_4 (pH 8.0), 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) で平衡化した 5 mL HisTrap HP (GE Healthcare) カラムにロードした。50 mL の binding buffer を流すことで全長コリシン D/ImmD-His6 複合体以外のタンパク質を洗い流した。その後、elution buffer (50 mM NaH_2PO_4 (pH 8.0), 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) で全長コリシン D/ImmD-His6 複合体を溶出した。

全長コリシン D/ImmD-His6 複合体を含むタンパク質溶液を 8 M urea + binding buffer に対して室温で一晩透析することで、全長コリシン D と

ImmD-His6 と分離させた。得られた溶液を、8 M urea + binding buffer で平衡化した 5 mL HisTrap HP (GE Healthcare) カラムにロードした。同じ buffer で 50 mL を流すことにより、全長コリシン D を溶出した。

得られた全長コリシン D を含むタンパク質溶液を 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) buffer に対して 4°C で、一晩透析をした。それを、20 mM Tris-HCl (pH 8.5) buffer で平衡化した 8 mL Mono Q 10/100 GL column (GE Healthcare) カラムにロードした。その後、20 mM Tris-HCl (pH 8.5) buffer と 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) buffer + 500 mM KCl との濃度勾配により溶出させ、主要なピークを全長コリシン D として分取した。得られた全長コリシン D 溶液を 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) buffer に対して透析した。

透析された全長コリシン D 溶液は、Vivaspin 20, 5000 MWCO PES (sartorius) を用い、遠心 (4°C, 7,000rpm) により濃縮した。濃度測定は、アミノ酸配列からモル吸光係数を推定し、A280 により濃度を見積もる方法により算出した。モル吸光係数を計算した算式は以下に示した。

$$\text{モル吸光係数} = 5690 \times \text{Try 数} + 1280 \times \text{Tyr 数} + 120 \times \text{Cys 数}$$

1-2-4 全長コリシン D の結晶化

結晶化のスクリーニングは、HAMPTON RESEARCH 社の Natrix, MembFac, PEG / Ion 1・2, Crystal Screen™ / Crystal Screen™ 2, 1/2 Crystal Screen™ / 1/2 Crystal Screen 2, Index を用い、Molecular Dimensions 社の MemGold™ を用いた。TTP LabTech 社のナノリッター分注システム mosquito を用い、20 mM

Tris-HCl buffer (pH 8.5)で平衡化された蛋白質溶液 0.2 μL と reservoir 0.2 μL とを混ぜた。Reservoir 体積は 50 μL とし、4°C もしくは 20°C で結晶化を行った。蛋白質の濃度は 10 mg/mL とした。

1-2-5 X線回折データ収集及び解析

X線回折データの収集は Photon Factory（高エネルギー加速器研究機構、つくば市）のビームライン PF-BL17A、及び SPring-8（財団法人高輝度光科学研究センター）のビームライン BL41XU を使用した。実際のデータ収集及び構造解析は東京大学定量生命科学研究所の佐藤裕介助教に行っていた。

1-3 結果

1-3-1 全長コリシン D の精製について

精製した蛋白質溶液を 12.5% SDS-PAGE で電気泳動したところ、全長コリシン D に相当する単一バンドが確認された。ImmD のバンド（約 11 kDa）がなかったことから、8 M urea の条件下で全長コリシン D と ImmD が完全に分離できたことが分かった（Fig. 1-1）。

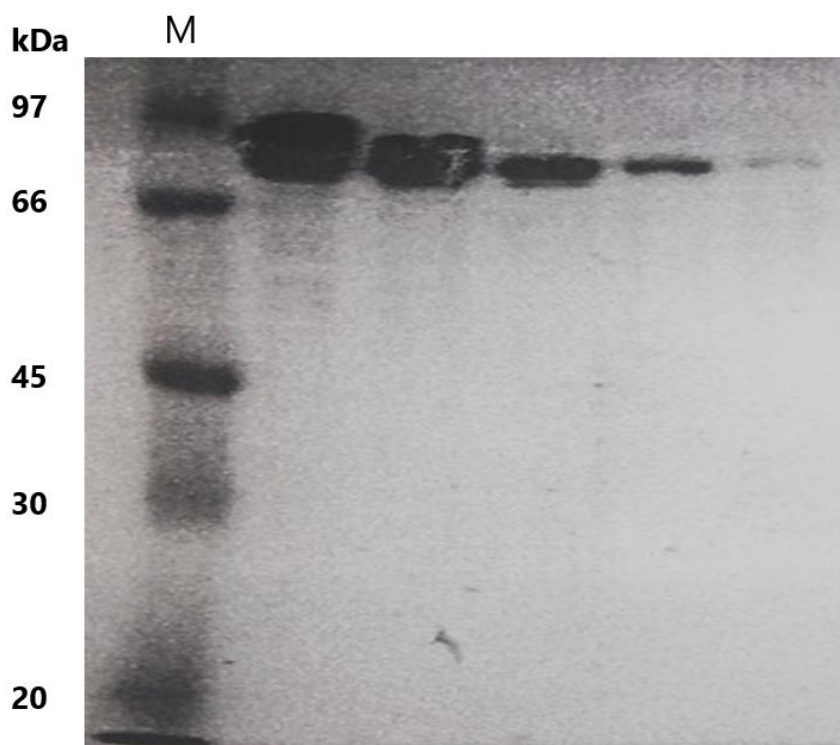


Fig. 1-1 精製した全長コリシン D の SDS-PAGE の結果

8 M urea の条件下で全長コリシン D と ImmD が完全に分離できており、全長コリシン D だけの画分を収集できた。5 倍ごとに連続希釈で SDS-PAGE を確認したところ、いずれも単一バンドが確認されたことで、全長コリシン D の N 末端側には分解されてないと考えた。

M はマーカ。

1-3-2 全長コリシンDの結晶化および高分解能を目指した立体構造解析の試み
以下の5つの条件下で結晶が観察できた (Fig. 1-2)。

(1) 1/2 Crystal Screen D2 (0.05 M HEPES sodium pH 7.5, 0.7 M Sodium citrate tribasic dihydrate)

(2) Index E11 (0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 22% w/v Polyacrylic acid sodium salt 5,100)

(3) Index G3 (0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350)

(4) Index H11 (0.1 M Potassium thiocyanate, 30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000)

(5) Index H12 (0.15 M Potassium bromide, 30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000)

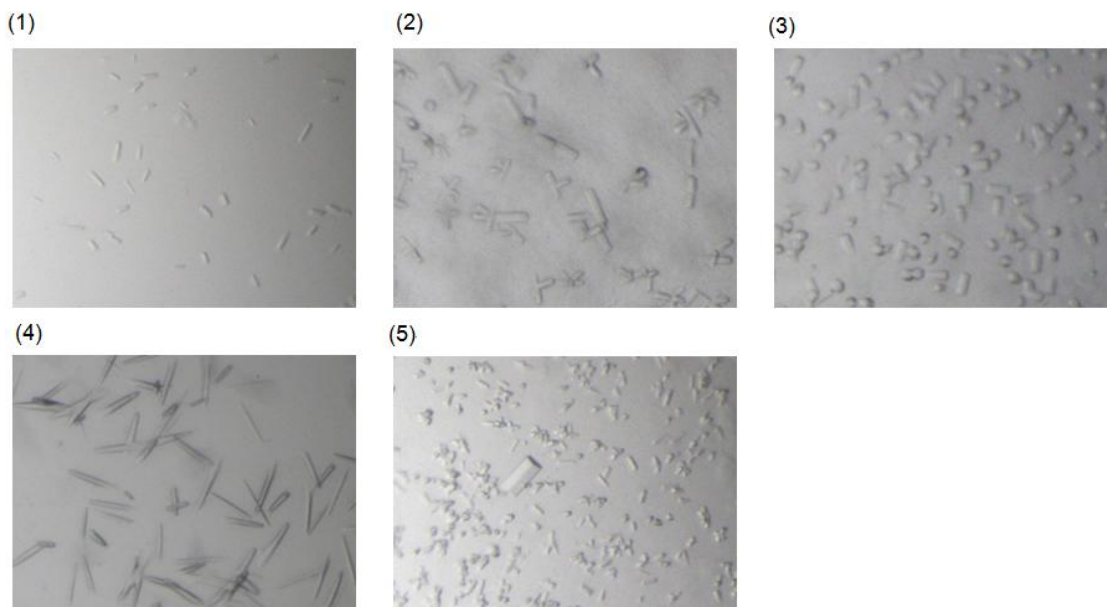


Fig. 1-2 全長コリシンDのスクリーニングで観察できた結晶

(1) 1/2 Crystal Screen D2

(2) Index E11

(3) Index G3

(4) Index H11

(5) Index H12

5つの条件で、いずれも顕微鏡で棒状の結晶を観察できた。しかし、結晶のサイズが小さく、回折実験に向かなかつた。結晶のサイズを大きくするために沈殿剤の濃度や溶液の pH を調整したところ、以下の2つの条件で結晶化が再現した (Fig. 1-3)。

(1') 1/2 Crystal Screen D2 (0.1 M HEPES sodium pH 7.2, 0.724 M Sodium citrate tribasic dihydrate)

(2') Index E11 (0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 24% w/v Polyacrylic acid 5100 sodium salt)

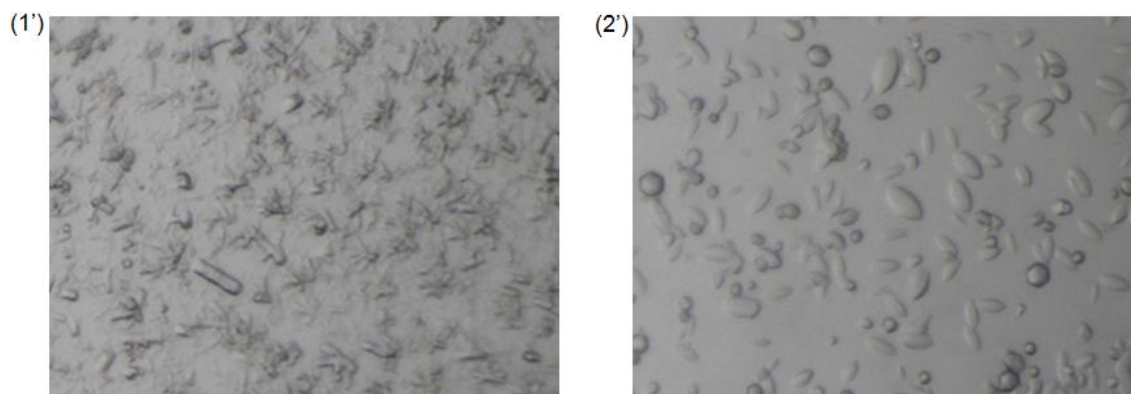


Fig. 1-3 沈殿剤の濃度や溶液の pH を変えて観察できた全長コリシン D の結晶

(1') 1/2 Crystal Screen D2 (0.1 M HEPES sodium pH 7.2, 0.724 M Sodium citrate tribasic dihydrate)

(2') Index E11 (0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 24% w/v Polyacrylic acid 5100 sodium salt)

1/2 Crystal Screen D2 の結晶に関して溶液の pH を変えたり、Additive Screen (HAMPTON RESEARCH)を試したが、より大きな結晶は得られなかつた。この中から収穫できるサイズの結晶を選び、SPring-8 で X 線回折実験を行った。

(2') の結晶に関してさらに溶液の pH を変えたり、沈殿剤の濃度を変えたりしたところ、アルカリ性 pH の溶液で結晶が大きくなった傾向があり、pH 9.0 や

pH 9.4 の条件下で一番大きい結晶を得た。また、pH 7.5 で、25%や 27% w/v Polyacrylic acid 5100 sodium salt の条件下でも結晶を得た (Fig. 1-4)。

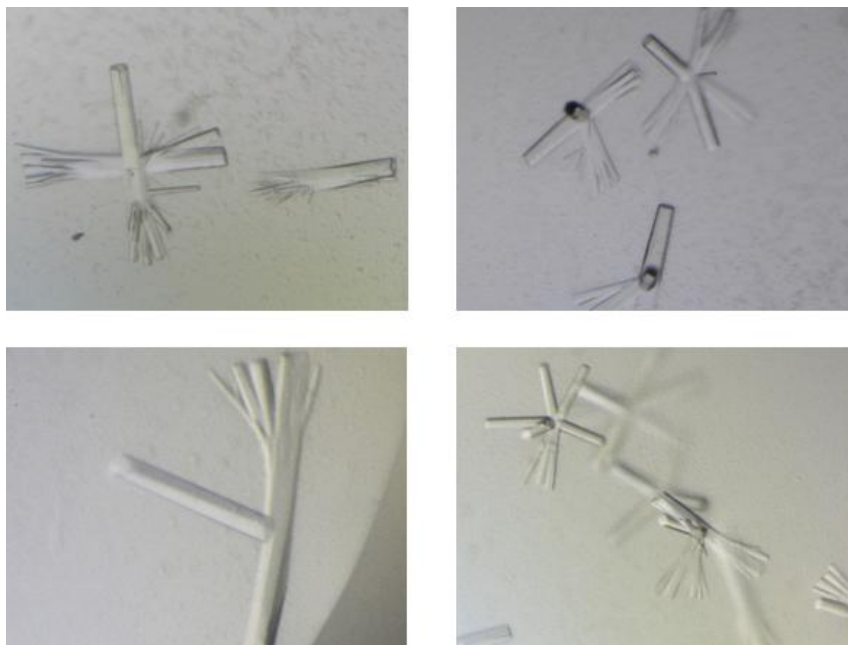


Fig. 1-4 Index E11 の結晶条件に基づいて沈殿剤の濃度や溶液の pH を変えて観察できた全長コリシン D の結晶

(左上) Index E11 (0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, **0.1 M Tris-HCl pH 9.0**, 24% w/v Polyacrylic acid 5100 sodium salt)

(右上) Index E11 (0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, **0.1 M Tris-HCl pH 9.4**, 24% w/v Polyacrylic acid 5100 sodium salt)

(左下) Index E11 (0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, **25% w/v Polyacrylic acid 5100 sodium salt**)

(右下) Index E11 (0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5, **27% w/v Polyacrylic acid 5100 sodium salt**)

SPing-8 の X 線回折実験で、最も高分解能の回折像を与えた結晶は(2') の条件であったが、 8.3 \AA にしか過ぎず、構造決定もできなかった。より良好な結晶を得るために、Additive Screen (HAMPTON RESEARCH) を試した。その結果、以下の 5 つの条件下で結晶を得た (Fig. 1-5)。

(1) Index E11 + Additive Screen B6 (2.0 M Sodium chloride)

(2) Index E11 + Additive Screen F6 (2.0 M NDSB-221)

(3) Index E11 + Additive Screen H4 (40% v/v Acetonitrile)

(4) Index E11 + Additive Screen H8 (40% v/v Acetone)

(5) Index E11 + Additive Screen H10 (7% v/v 1-Butanol)

(以上に表記した Index E11 の溶液組成は、0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Tris-HCl pH 9.0, 24% w/v Polyacrylic acid 5100 sodium salt)

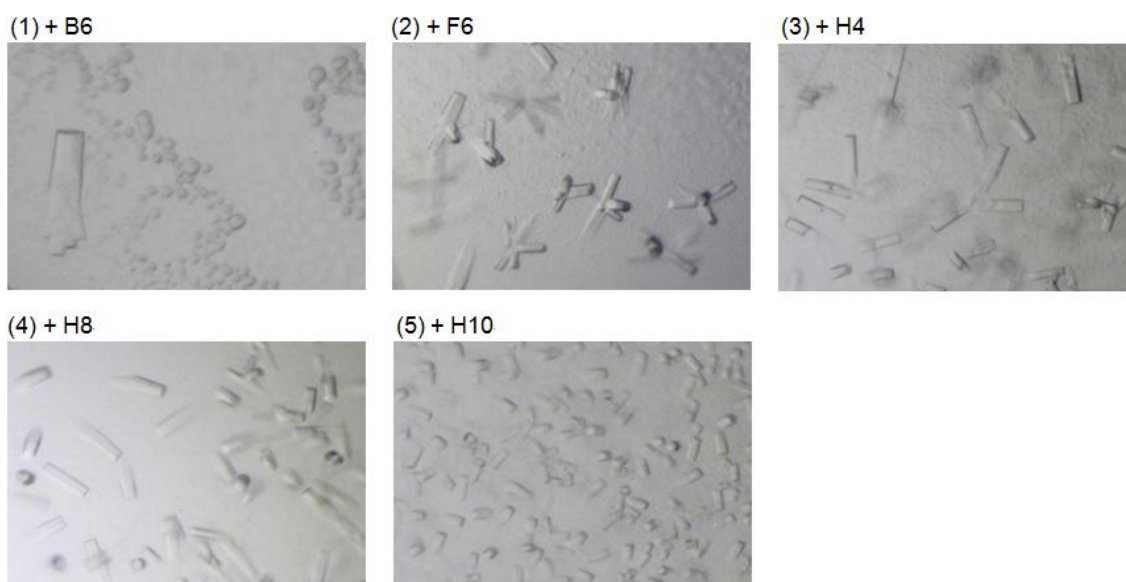


Fig. 1-5 Index E11 の結晶条件に基づいて Additive スクリーニングを用い、全長コリシン D で観察できた結晶

(1) + Additive Screen B6

(2) + Additive Screen F6

(3) + Additive Screen H4

(4) + Additive Screen H8

(5) + Additive Screen H10

SPing-8 の X 線回折実験の結果では、最高分解能は前の結果と殆ど変わらなかった。全長コリシン D に関しては、分解能が高くていい結晶が得られないと判断した。

1-4 考察

全長コリシン D の結晶化実験は複数回繰り返し、様々な条件を試したが、高い分解能を示す結晶は得られなかった。分解能が低い理由は、コリシン D のドメイン配置がコンパクトではなく、分子間の距離が長いためと考えた。コリシン D は感受性菌の細胞内に入るには、感受性菌の外膜や内膜を通過しなければならない。Chauleau らの研究により、細胞質で検出されたコリシン D の領域は、アミノ酸配列 590 - 697 であることが分かっている[Chauleau M et al., 2011]。以上のことから、CRD 以外の領域は、感受性菌の外膜や内膜を通過するため translocation 機能を持ち、細孔を通るように形状が変化すると考えられる。そこで、コリシン D 結晶の分解能を向上させるため、N 末端側を切り詰めることを考えた。コリシン D の配列を用いて相同性検索してみたところ、N 末端領域のアミノ酸配列は、コリシン B の N 末端領域と、95.2%の同一性があることが分かった（313 アミノ酸残基のうち 15 個が不一致）。コリシン B の C 末端のドメインは、感受性菌の内膜に穴を開け、イオンチャネルを形成し、膜電位を消失させることで細胞を殺す機能を持っているのに対し、N 末端のドメインは、感受性菌の外膜を通過するための translocation 機能を持っている（Fig. 1-6）。従って、コリシン D のコリシン B と似た N 末端 translocation ドメインを欠失させることで、分解能が高い結晶が得られると予想した。

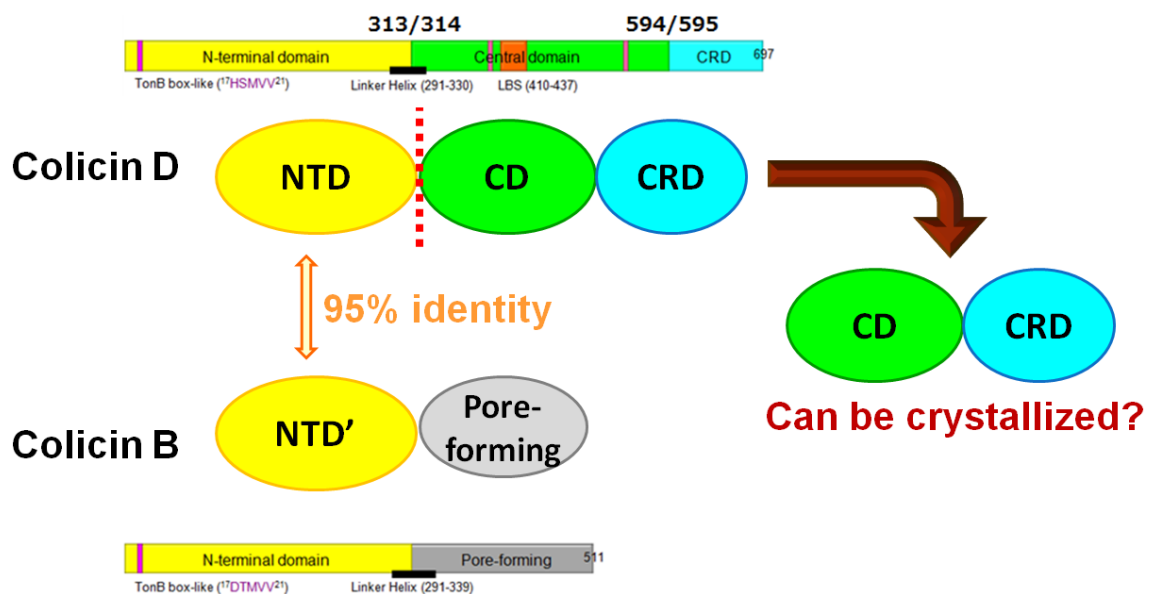


Fig. 1-6 コリシン B と D の比較

コリシン B の構造を参考にして、コリシン D の N 末端側を切り詰めた。

全長コリシン B の結晶構造で、左側の赤い線で囲まれた領域は N 末端である translocation ドメインであり、右側の灰色領域は C 末端である pore-forming ドメインである[Hilsenbeck JL et al., 2004]。コリシン D の N 末端である 313 個アミノ酸配列は、コリシン B の N 末端と 95.2% の配列同一性がある (313 残基のうち 15 残基が不一致)。

第 2 章 コリシン D313 (central ドメイン- C 末端 RNase ドメイン) 及び N 末端 translocation ドメインの構造解析

2-1 目的

前章では、全長コリシン D の結晶が得られたが、X 線回折データ実験の結果により、分解能が低く構造解析できなかった。これは、全長コリシン D の構造の flexibility が高いため分解能が高い結晶が得られなかったと考えた。コリシン D の N 末端側の領域 (1 - 313 番) は、コリシン D と同じレセプターおよび透過経路を利用して感受性菌へ侵入するコリシン B と高い相同性が見られる。本章では、コリシン B と高い相当性を示すコリシン D の 1 - 312 番のアミノ酸配列を切り詰め、コリシン D313 - 697 のコンストラクト (コリシン D313) を作製した。コリシン D313 は全長よりコンパクトな構造を形成し、分解能が高い X 線回折データが得られると期待した。また、N 末端ドメインのみのコリシン D1 - 321 のコンストラクトの結晶化も試した。

これまでの実験で、コリシン D の N 末端側に分解しやすい領域があると分かっていたため、コリシン D の構造は活性ドメインである CRD (CoID595 - 697) しか決定されていなかった。本実験では、初めてコリシン D の central ドメインと CRD が繋がった状態での結晶構造を決定した。そこから、コリシン D の全体構造を構築し、感受性大腸菌の細胞内に入る translocation 経路を推定した。

2-2 材料と方法

2-2-1 使用菌株とプラスミド

目的タンパク質の発現には、大腸菌 W3110 株を用いた。コリシン D313/ImmD 複合体およびコリシン D1-321 を発現するプラスミドを以下の方法で作製した。

コリシン D313/ImmD 複合体は、1-2-1 で作ったプラスミド pDDfull-CoID を鋳型として、5' 末端としてアミノ酸 313 番付近に *SphI* サイト (GCATGC) プラス一つの His になるように (GCATGCAC)、また、コリシン D 配列の上流 5' 末端にも *SphI* サイトを導入するように、コリシン D1 - 312 のコード領域を除いて、PCR により増幅した。得られた断片を、*SphI* で切断した後に、self-ligation をした。以降、このプラスミドを pDDCoID313 と呼ぶ。なお用いたプライマーを以下に示した。

Plasmid の模式図: (←CoIDHead-*SphI* *SphI*-His-CoID313→)

SphI-His-313-Fw:

5' -AAGCATGCACGAAGAAGCGGTAGCCCGGGC-3'

CoID-Head-*SphI*-Rv:

5' -TTGCATGCAAATTCCTCTTTTAAGCGTTAAAACAATTGATTACACG-3'

コリシン D1-321 は、1-2-1 で作ったプラスミド pDDfull-CoID を鋳型とし、ImmD の途中か下流方向への配列の 5' 末端に *SphI* サイトを導入して、コリシン 321 配列の 3' 末端に His-tag および *SphI* サイトを導入するように

pDDfull-CoID を PCR により増幅した。得られた断片を、*SphI* で切断した後に self-ligation をした。以降、このプラスミドを pDDCoID1-321 と呼ぶ。なお用いたプライマーは以下に示した。

Plasmid の模式図: (←CoID321-(His)₆-TGA-*SphI* *SphI*-ImmD→)

SphI-ImmD-Fw:

5' -AAAGCATGCGCTGCTGAGCGATTTGAGCC-3'

321-(His)₆-TGA-*SphI*-Rv:

5' -TTGCATGCTCAATGATGATGATGATGATGAGCTTCAGCCCGGGCTACCG-3'

2-2-2 コリシン D313/ImmD-His 6 複合体およびコリシン D1-321 の発現

コリシン D313/ImmD-His 6 複合体およびコリシン D1-321 の発現は 1-2-2 と同様に行った。

2-2-3 コリシン D313 およびコリシン D1-321 の精製及び濃縮

コリシン D313 の精製及び濃縮は 1-2-3 と同様に行ったが、一点だけ、8 M urea + binding buffer を 6 M urea + binding buffer に変更した (6M urea だと低温室で操作しやすいため)。コリシン D1-321 の精製は 1-2-3 と同様に行ったが、2 回目の HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) カラム精製 (8 M urea + binding buffer) を除いた。

2-2-4 コリシン D313 およびコリシン D1-321 の結晶化

コリシン D313 およびコリシン D1-321 の結晶化は 1-2-4 と同様に行った。

2-2-5 Se-Met ColD313 の精製及び濃縮

Se-Met ColD313 タンパク質を得るために、菌体を M9 最少培地で培養し、培養液に 50 mg/L L-SeMet を添加した。大量発現およびタンパク質の精製は、野生型コリシン D313 と同様に行った。Se-Met-ColD313 タンパク質を精製し、結晶化スクリーニングを試したところ、結晶の成長が観察されなかった。そこで、メチオニンの数を減らすため、QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用い、コリシン D313/ImmD-His₆ 複合体タンパク質に 3 重変異 (M344K/M345A/M352L) を導入し、作製したプラスミドをメチオニン要求株大腸菌 W2252 株[Bachmann BJ, 1972]に形質転換した(理由は 2-3-3 に述べる)。Se-Met ColD313/ImmD-His₆ 複合体タンパク質の発現、精製および濃縮方法は Se-Met-ColD313 タンパク質と同様に行った。

2-2-6 X 線回折データ収集及び解析

X 線回折データの収集は 1-2-5 と同様に行った。実際のデータ収集及び構造解析は東京大学定量生命科学研究所の佐藤裕介助教に行っていただいた。

2-2-7 Gel-filtration により、コリシン D313 の分析

HPLC システム(Shimadzu)を用い、精製したコリシン D313 タンパク質を 25 mM HEPES-Na (pH 7.5), 100 mM K₂SO₄, 0.025% *n*-dodecyl β-D-maltoside,

0.0025% cholesteryl hemisuccinate buffer で平衡化した Superdex 200 5/150 GL (GE Healthcare)カラムにロードし、同じ組成の buffer で 0.5 ml/min で流した。マーカートンパク質は、Gel Filtration Standard (Bio-Rad)を用いた。A280 により検出した。

2-2-8 多角度光散乱検出器によるコリシン D313 の分子量測定 (SEC-MALS)

精製したコリシン D313 タンパク質は Vivaspin 20, 5000 MWCO PES (sartorius) を用い、遠心 (4°C, 7,000rpm) により終濃度 1.0 mg/mL に濃縮し、20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl buffer で平衡化した ENrich SEC 650 (10 × 300mm) column (Bio-Rad)カラムにロードし、同じ組成の buffer で 0.5 ml/min を流した。MALS のデータ検出は、DAWN HELEOS 8 + detector (Wyatt Technology), RF-20A UV detector (Shimadzu)で行い、データの分析はソフトウェア ASTRA (Wyatt Technology)で行った。

2-3 結果

2-3-1 コリシン D313 およびコリシン D1-321 の精製について

精製したタンパク質溶液を 14% SDS-PAGE で分析したところ、コリシン D313 およびコリシン D1-321 に相当する単一バンドが確認された。ImmD のバンドを確認できなかったことから、6 M urea の条件下でコリシン D313 と ImmD が完全に分離できたことが分かった (Fig. 2-1, Fig. 2-2)。

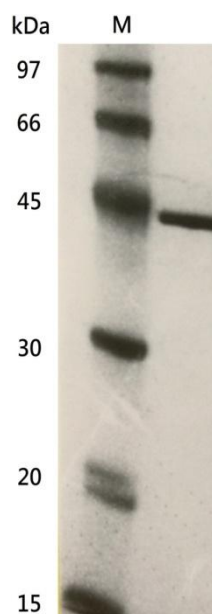


Fig. 2-1 精製したコリシン D313 の SDS-PAGE の結果

6 M urea の条件下で、分子量約 43.8 kDa のコリシン D313 と ImmD (約 27.5 kDa) が完全に分離され、コリシン D313 だけの画分を収集できた。M はマーカー。

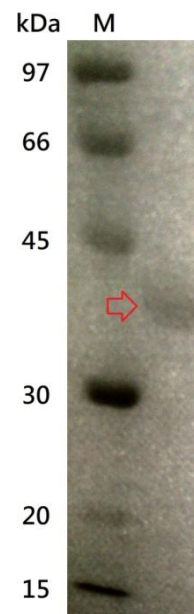


Fig. 2-2 精製したコリシン D1 - 321 (約 34.2 kDa) の SDS-PAGE の結果
M はマーカー。

2-3-2 コリシン D313 の結晶化について

いくつかの条件下で結晶の成長が観察できたが、そのうち 3 つの条件下で結晶が観察できた (Fig. 2-3)。

(1) Crystal Screen D3 (0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 2.5% v/v Polyethylene glycol 400, 2.2 M ammonium sulfate)...分解能 1.85Å

(2) MembFac E2 (0.1 M Zinc acetate dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 12% w/v Polyethylene glycol 4,000)...分解能 2.01Å

(3) 1/2 Crystal Screen D9 (0.2 M Zinc acetate dihydrate, 0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 18% w/v Polyethylene glycol 8,000)...分解能 3.43Å



Fig. 2-3 コリシン D313 のスクリーニングで観察された結晶

(1) Crystal Screen D3

(2) MembFac E2

(3) 1/2 Crystal Screen D9

2-3-3 Se-Met コリシン D313 の結晶化について

次に Se-SAD 法を用いた位相決定を試みた。メチオニン要求大腸菌株を用いてセレノメチオニン標識タンパク質コリシン D313 を作製するため、最初は最もよく使われている大腸菌 B834 (DE3)株を用いた。B834 (DE3)株は、メチオニン生合成の最後のステップの MetE (methionine synthase) に変異が入っているため、増殖にメチオニンかビタミン B12 が必要となる。しかし、複数回の実験を繰り返したが、十分な量の Se-Met-ColD313 を発現できなかった (Fig. 2-4)。

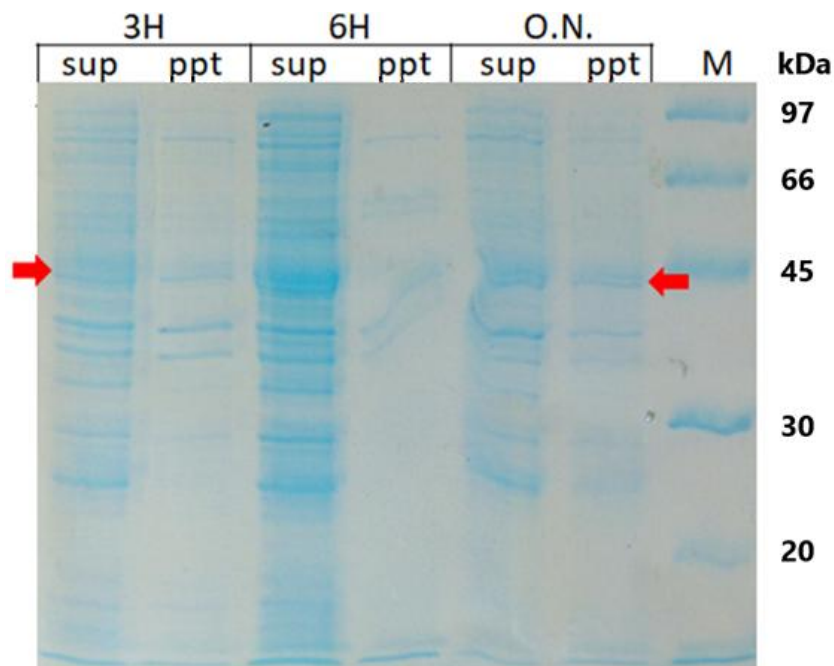


Fig. 2-4 大腸菌 B834 (DE3)株を用いて Se-Met-ColD313 を発現誘導し、SDS-PAGE で確認した結果

10 mL scale で培養し、発現誘導の時間を 3 時間 (3H)、6 時間 (6H) および overnight (O.N.) に変えて、SDS-PAGE で目的タンパク質が発現したかどうかを確認した。赤い矢印で示したところは目的タンパク質に相当する分子量である。どれも発現したバンドが見えない。

M はマーカー。

sup は菌体を破碎して遠心した上清液。

ppt は菌体を破碎して遠心した沈殿。

量が低い原因は、B834 (DE3)株が *lacUV5* プロモーター制御下の T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子をコードした λ DE3 遺伝子を持っているためだと考えた。通常の IPTG 誘導法の場合、B834 (DE3)株に目的のタンパク質遺伝子を組み入れた T7 プロモーター発現ベクターを導入すると、IPTG を添加することで、*lac UV5* プロモーターにより T7 RNA ポリメラーゼが誘導され、このポリメラーゼが T7 プロモーターからの目的タンパク質遺伝子の転写を引き起こし、これにより目

的タンパク質の大量発現が行われる。しかし、特定の条件下（例えば紫外線や化学物質による宿主細胞の損傷）で λ DE3 プロファージは活性化される。 λ DE3 プロファージは2つのモードを持つ、1つはプロファージ誘発と呼ばれる過程により、細菌の染色体から切り離される。その後、増殖サイクルによるウイルスのDNA複製が始まる。もう1つは、プロファージの lytic cycle である。プロファージが lytic cycle と、多くの場合、DNA損傷による SOS 応答を引き起こし、溶菌化を引き起こしてしまう。通常の IPTG 誘導には特に影響がないが、コリシンは SOS 応答によって発現するタンパク質であり、コリシンを大量発現する前に宿主細胞は先にプロファージの作用で溶菌されているのではないかと考えた。改善策としてメチオニン要求大腸菌株を K-12 由来の株で、MetB (cystathionine γ -synthase) に変異が入っている W2252 株に変えた。

W2252 株を用いて native タンパク質を発現し、SDS-PAGE で ColD313 の発現誘導を確認したところ、大量発現した目的バンドを確認できた (Fig. 2-5)。

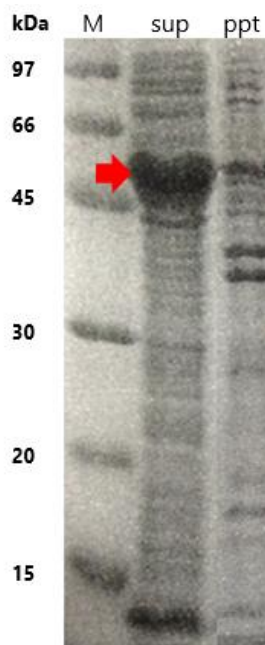


Fig. 2-5 大腸菌 W2252 株を用いて Se-Met-ColD313 を発現誘導し、SDS-PAGE で確認した結果

10 mL scale で培養し、発現誘導を 3 時間かけて、SDS-PAGE で目的タンパク質に相当するバンドを確認した (赤い矢印のバンド)。

M はマーカー。

sup は菌体を破碎して遠心した上清液。

ppt は菌体を破碎して遠心した沈殿。

しかし、セレノメチオニンを用いて大量発現したところ、集菌した菌体は色の異なる 2 種の層に分かれた (Fig. 2-6)。その原因は不明だが、セレノメチオニンを多く含むタンパク質が異常に発現した、或いはタンパク質の溶解度が大きく変化したことにより、一部の大腸菌細胞の状態に影響があった可能性が考えられる。



Fig. 2-6 大腸菌 W2252 株を用いて Se-Met-CoID313 を大量培養し、mitomycin C を用いて 3 時間発現誘導した。集菌した菌体は 2 色がみられた。

また、Se-Met-CoID313 の結晶化および Se-Met-CoID313-ImmD 複合体の結晶化は、何度も最初の結晶化スクリーニングを試したが、結晶がまったく観察できなかった。理由の一つとして、大量のメチオニンをセレノメチオニンに置換したために、タンパク質の溶解度や性質が変わってしまった可能性が考えられる。セレノメチオニン置換体の構造解析には、100 残基中に一つのセレノメチオニンがあれば十分だと言われている。メチオニンの数を減らすため、コリシン D313 の N 末端にある 3 つの近いメチオニン残基を変異した。変異するコドン中の塩基の数ができるだけ少なくなるように、344 番の Met (ATG) を Lys (AAG) に、345 番の Met (ATG) を Ala (GCG) に、352 番の Met (ATG) を Leu (CTG) に変異し、CoID313 (M344K/M345A/M352L) の 3 重変異体を作製した (Fig. 2-7)。

EEA³⁴⁴VARAEAEKAKAELFSKAGV³⁴⁵NQPPVYTQEMMERANSV³⁵²MNEQGALVLNN
 TASSVQLAMTGTGVWTAAGDIAGNISKFFSNALEKVTIPEVSPLLMRISL
 GALWFHSEEAGAGSDIVPGRNLEAMFSLSAQMLAGQG³⁴⁴VVIEPGATSVNLP
 VRGQLINSNGQLALDLLKTGNESIPAAVPV³⁴⁵LVNAVRDTATGLDKITLPAVV
 GAPSR³⁵²TILVNPVPQPSVPTDTGNHQVPVTPVHTGTEVKSVEMPVTTITP
 VSDVGGLRDFIYWRPDAAGTGVEAVYV³⁴⁴MLNDPLDSGRFSRKQLDKKYKHA
 GDFGISDTKKNRETLTKFRDAIEEHLSDKDTVEKGT³⁴⁵YRREKGSKVYFNP
 N³⁵²TMNVVIKSNGEFLSGWKINPDADNGRIYLETGEL

Fig. 2-7 コリシン D313-697 の配列を示しており、Met を赤色で表記した 385 個アミノ酸配列のうち、10 個の Met が入っている。

セレノメチオニンを用いて大量発現したところ、集菌したすべての菌体も通常の通りに単一色になった。セレノメチオニン CoID313 (M344K/M345A/M352L) タンパク質を精製すると、セレノメチオニン CoID313 に相当する単一バンドが確認された (Fig. 2-8)。

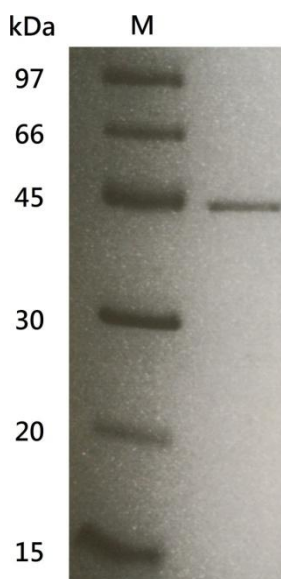


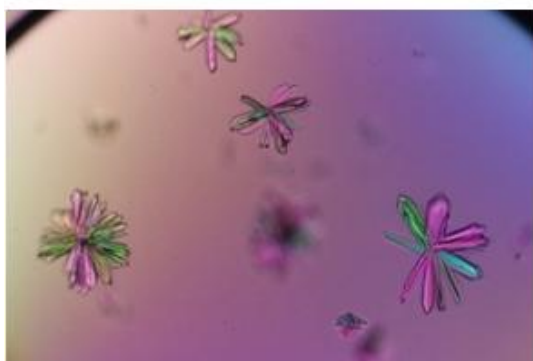
Fig. 2-8 精製した Se-Met 置換体コリシン D313 (M344K/M345A/M352L)変異体の SDS-PAGE の結果 M はマーカー。
 sup は菌体を破碎して遠心した上清液。
 ppt は菌体を破碎して遠心した沈殿。

結晶化スクリーニングを試してみた結果、いくつかの条件下で結晶が観察でき、そのうち2つの条件下で結晶が観察できた (Fig. 2-9)。

(1) Crystal Screen A9 (0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dehydrate pH 5.6, 30% w/v Polyethylene glycol 4000)

(2) Index F6 (0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350)...分解能 1.83Å

(1)



(2)



Fig. 2-9 Se-Met 置換体コリシン D313 (M344K/M345A/M352L)

変異体のスクリーニングで観察された結晶

(1) Crystal Screen A9

(2) Index F6

2-3-4 コリシン D313 の構造について

Se-Met-CoID313 のデータセットを用いてコリシン D313 結晶データの位相を解くことに成功した。そして、2-3-2 節の(1)の条件で得られた結晶の native データセットを用いて、分解能 1.83Å で結晶構造を決定した (Table 2-1)。

Table 2-1. Data collection and refinement statistics

	CoID313 triple mutant SeMet	CoID313 native
Data collection		
PDB code		5ZNM
Beamline	KEK-PF BL17A	SPring-8 BL41XU
Wavelength (Å)	0.9788	1.0000
Space group	C2	C2
Unit cell		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	115.7, 146.0, 45.9	116.4, 146.1, 45.8
β (°)	102.1	102.5
Resolution (Å)	50.00–1.83 (1.86–1.83)	50.00–1.85 (1.88–1.85)
Total reflections	547,063	310,995
Unique reflections	64,822	63,995
Completeness (%)	94.5 (75.7)	96.4 (93.9)
Redundancy	8.9 (5.5)	5.1 (3.8)
Mean $I/\sigma(I)$	16.4 (2.1)	14.1 (1.8)
R_{sym} (%)	11.4 (35.4)	8.0 (44.1)
Refinement		
Resolution (Å)		44.84–1.85
No. of reflections		61,089
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$		17.2/21.2
No. of atoms		5,506
No. of solvents		299 (water), 12 (glycerol), 6 (SO ₄)
RMSD from ideal values		
Bond lengths (Å)		0.009
Bond angles (°)		0.973
Ramachandran plot (%)		
Favored		96.7
Allowed		3.2
Disallowed		0.1

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

本研究で得たコリシン D313 の非対称単位中にモデルした結晶構造を Fig. 2-10 に示した。開始コドンの ATG (Met) を入れる際は、制限酵素 *SphI* の認識する配列 GCATGC を用いた。フレームがずれないようにするため、更に 2 塩基 (AC) を加え、2 番目のコドンは CAC (His) とした。A, B 鎖は、両方とも Ile400 - Val403 および Leu415 - Arg432 がディスオーダーしていた。更に A 鎖では Thr558 - Ser564 が、B 鎖では Thr558 - Asp565 がディスオーダーしていた。結晶構造の非対称単位に含まれている 2 つのポリペプチド鎖はほぼ同じ構造をとっており、A 鎖(色付きのドメイン)と B 鎖(灰色のドメイン)の root mean square deviation (RMSD) は 0.18 Å であった。A 鎖から見ると、青色の長いヘリックス (CoID313-330) はコリシン B の構造と重ね合わせられる領域である。緑色の領域は今回新しく立体構造を解いた CD で、シアンの領域は活性ドメイン CRD である。

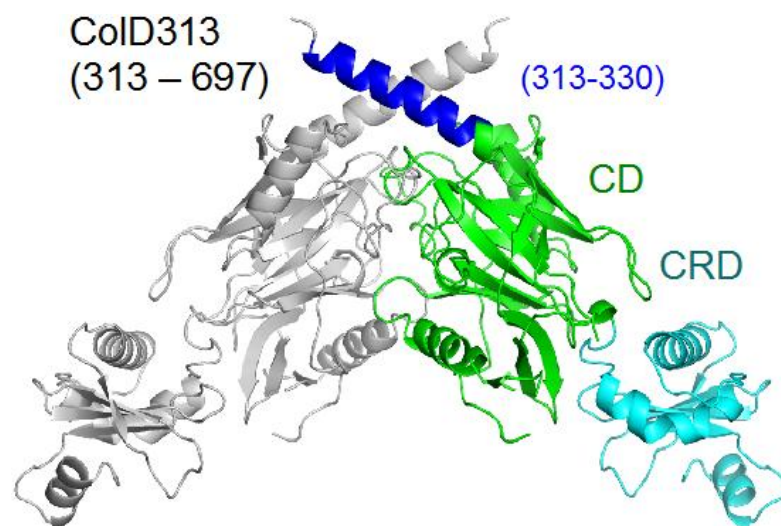


Fig. 2-10 コリシン D313 の結晶構造 (PDB ID: 5ZNM)
結晶構造中の二量体はほぼ同じ構造で、A 鎖(右側の色付きのドメイン)と B 鎖 (左側の灰色のドメイン) の RMSD は 0.18Å である。
青色はコリシン B の構造と重ね合わせられる領域 (313 - 330) である。
緑色は今回初めて立体構造が明らかになったドメイン (CD)。
シアンは活性ドメイン (CRD)。

コリシン D313 結晶構造中の CRD は、CRD-ImmD の結晶構造中の CRD (Fig. 0-7、PDB ID: 1TFO) [Yajima S et al., 2004]によく似ており、Leu595 - Leu697 の 103 個のアミノ酸残基の C_{α} について、RMSD を計算すると 0.58 \AA であった。

Mora らの結果によると、全長のコリシン D (1 - 697) は水溶液中で 2 量体構造になっていることが示されている[Mora L et al., 2015]。そこで、本研究で結晶構造に用いたコリシン D313 (CD-CRD) の溶液中でのオリゴマー状態を調べた。精製したコリシン D313 の SDS-PAGE の結果では、分子量は約 43.8 kDa であった (Fig. 2-1)。Gel-filtration カラムで解析した結果からは、溶液中の分子量は約 45.3 kDa と推定された (Fig. 2-11)。

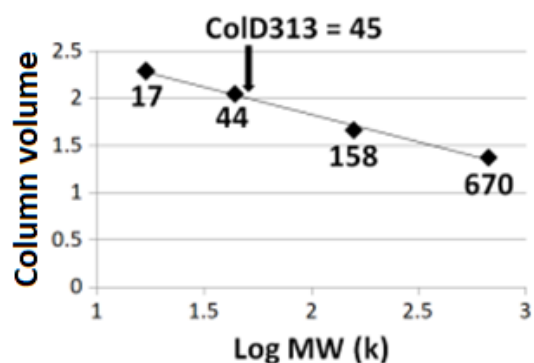
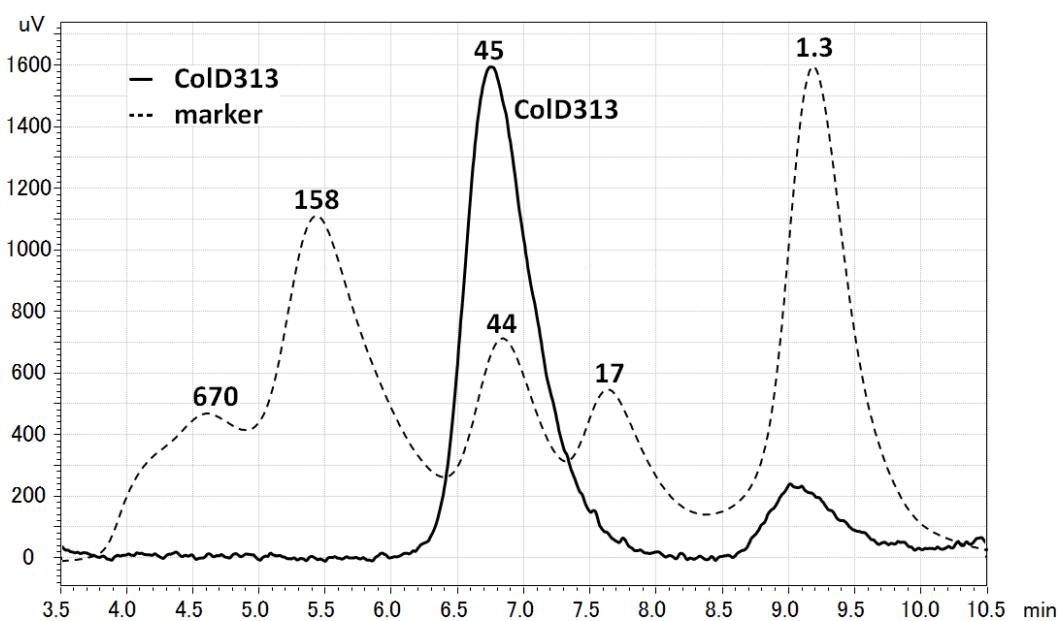


Fig. 2-11 精製したコリシン D313 を gel-filtration カラムで解析した結果

コリシン D313 の水溶液中の分子量は約 45.3 kDa であると推定された。

SEC-MALS 法によるコリシン D313 の測定からは、約 40.0 kDa と推定された (Fig. 2-12)。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC; またはゲルろ過とも呼ぶ) は、タンパク質の分子量を測定する分析法として、簡便であるという長所を持っている。しかし、タンパク質の立体構造の違いや、イオン性、疎水性の違いにより、タンパク質分子量マーカを用いた較正曲線では、真の絶対分子量が得られないことが欠点である。一方、多角度光散乱検出器 (MALS) は、試料溶液に一定波長のレーザー光を照射し、レイリー散乱によって試料から生じた散乱光強度を計測する。SEC と MALS を同時に測定することにより、両者の長所を生かし、欠点を補う手法である。

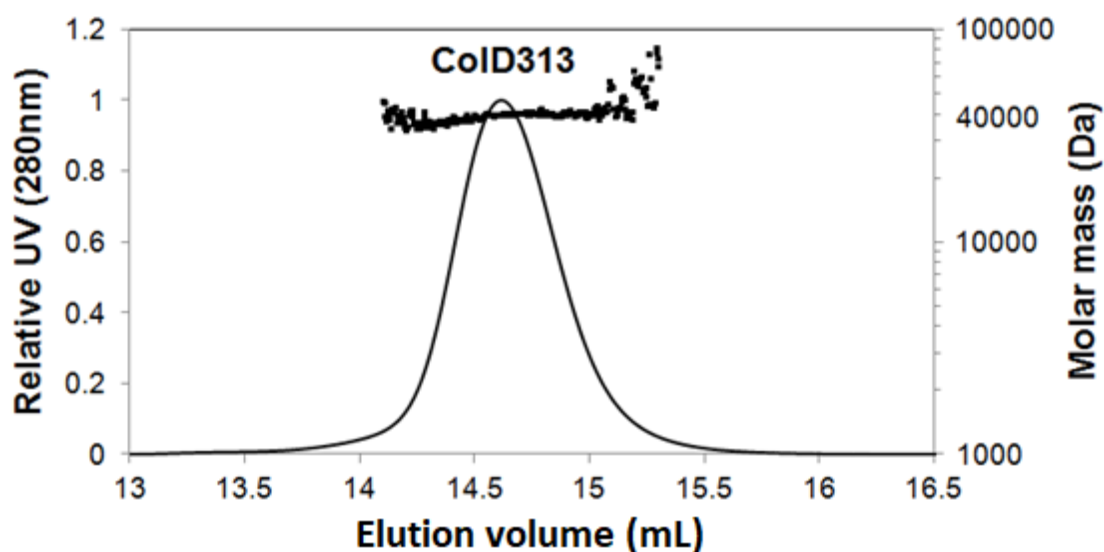


Fig. 2-12 精製したコリシン D313 を SEC-MALS で解析した結果
精製したコリシン D313 の水溶液中の分子量は約 40.0 kDa である。

以上の結果から、コリシン D313 は水溶液中ではモノマー構造をとっていると考えられた。Mora らの全長のコリシン D を用いた結果との違いは、恐らくコリシン D の N 末端ドメイン (1-312) の存在がダイマー化構造を形成させるこ

とを示唆している。

更に、CD-CRD の結晶構造の中のパッキングからあり得る組み合わせを調べるため、PISA サーバー（タンパク質の相互作用四次構造形成の予測、構造上類似性のある相互作用の検索に用いられる）を用いて、コリシン D313 の結晶構造中の相互作用を評価した。4 つの予測結果が得られた（Fig. 2-13）。

PQS set	mm	Formula	Composition	Id	Stable	Surface	Buried	ΔG^{int}	ΔG^{diss}	
NN	«»	Size				area, sq. Å	area, sq. Å	kcal/mol	kcal/mol	
1(*)	○	4	A ₄	A ₂ B ₂	1	yes	64600	8970	-62.9	16.1
2(*)	●	2	A ₂	AB	2	yes	33550	3240	-19.3	13.4
3	○	2	A ₂	AB	3	yes	33760	3030	-12.2	4.4
4(*)	○	2	A ₂	AB	4	yes	35540	1250	-12.2	2.0

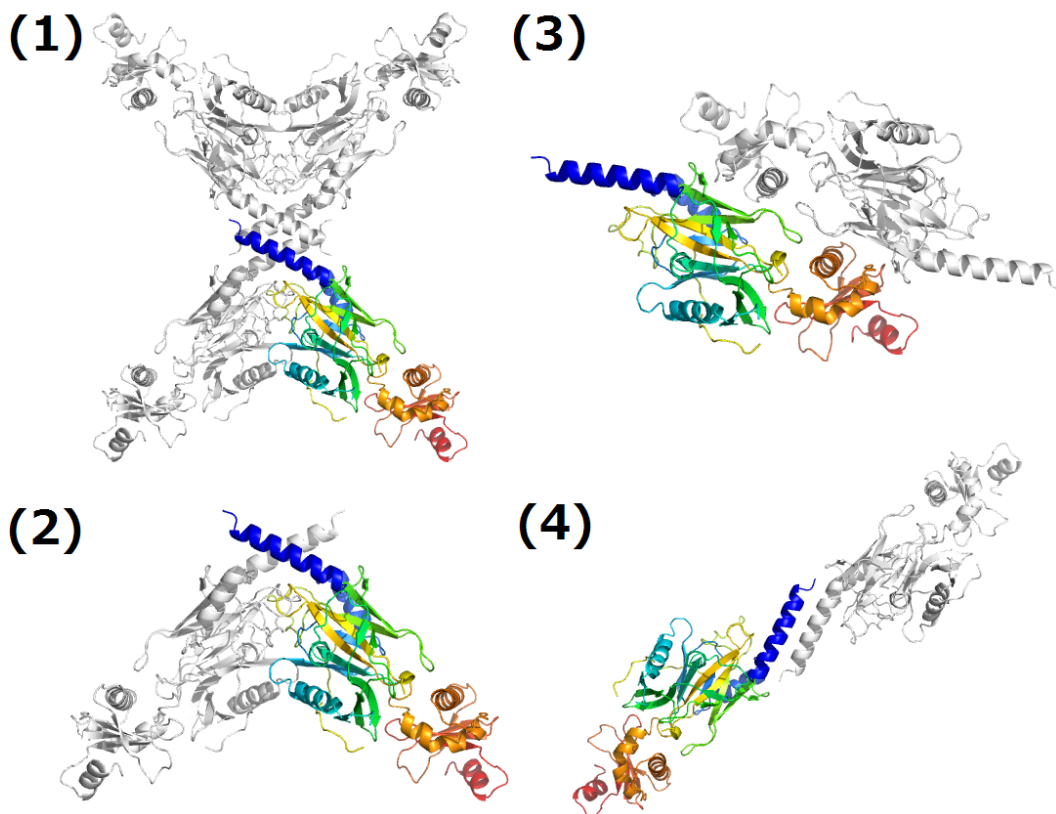


Fig. 2-13 PISA サーバーで、コリシン D313 の結晶構造の相互作用を評価した 1 番の予想結果だけが結晶構造の 4 量体構造（2 と 4 の組み合わせ）で、2 ~ 4 番の予想結果は結晶構造中の 2 量体構造である。単量体にのみ色付けしてある。

1 番の予想結果 (4 量体) は、タンパク質解離の自由エネルギー ($\Delta G^{\text{diss}} = 16.1$ kcal/mol) が一番高いが、全長のコリシン D では、おそらく NTD が立体障害を起こすと考えられた。4 番の予想結果 (2 量体) は、二つのリンカーヘリックス (313 - 330) が近づくため、同じく全長のコリシン D では NTD が立体障害を起こすと考えられた。2 番 (クロスした相互作用) と 3 番 (背中合わせ) の予想結果は、全長のコリシン D でも NTD が立体障害を起こさないため、可能な 2 量体構造だと考えられた (Fig. 2-14)。特に、2 番の予想結果は、エネルギー ($\Delta G^{\text{diss}} = 13.4$ kcal/mol) 的に最もあり得る全長の二量体構造だと考えられた。

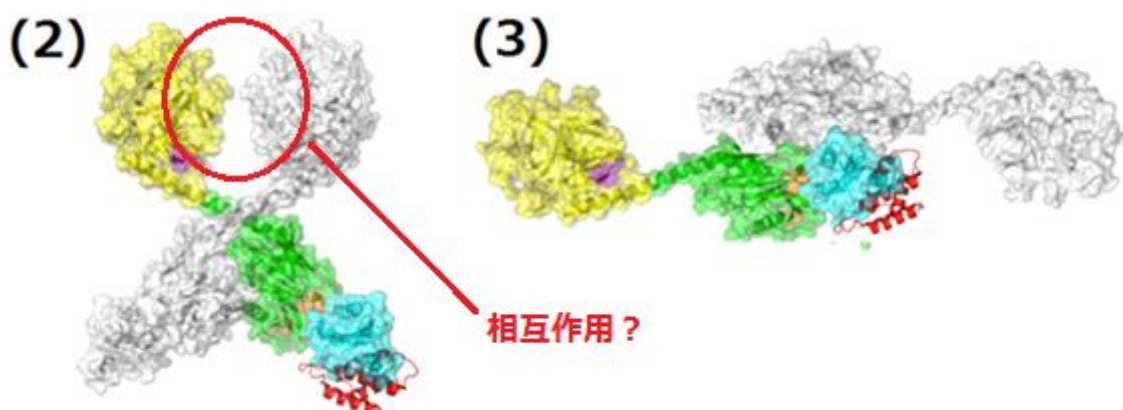


Fig. 2-14 PISA サーバーの結果をもとに、全長コリシン D の結晶構造をモデリングした結果

2 番 (クロスした相互作用) と 3 番 (背中合わせ) の予想結果は、全長でも可能な 2 量体構造だと予想された。

PISA サーバーの結果を元に、全長コリシン D の立体構造をモデリングした。全長のコリシン D-ImmD は、水溶液中では Fig. 2-14, (2) 番に示したように cross-shaped dimer 構造で存在すると示唆された。2 番の予想結果では、2 つの NTD が近くに存在するため、ここに相互作用が生じる可能性がある。従って、NTD 失ったコリシン D313 は、ダイマー化構造を形成できず、水溶液中ではモ

ノマー状態で存在すると考えられた。

2-3-5 コリシン D1-321 の結晶化について

NTD の構造を、ホモロジーモデリングではなくコリシン D 自身のものを用いることを目指して、コリシン D の NTD (1 - 321) の結晶構造決定を試みた。コリシン D1-321 の結晶化実験は複数回試した。1 回目の結晶化実験のサンプル濃度は、コリシン D313 の結晶化条件と同じように 10 mg/mL であった。結晶化の条件は 20°C および 4°C で行ったが、両方とも結晶の成長を観察できなかった。更なる結晶化のスクリーニングで、一枚の plate 当たりの沈殿の割合が低いことが分かった (96 well plate のうち 5 - 20 個 well にしか沈殿が出なかった)。NTD ドメインのみでは、溶解度が非常に高いと考えられたために、沈殿の割合を増やすために結晶化サンプルを濃縮し (20 mg/mL, 30 mg/mL, 50 mg/mL)、再度結晶化のスクリーニングを試した。しかし、溶解度は相変わらず非常に高く、沈殿の割合はあまり変化しなかった。結晶化の温度条件は 20°C および 4°C で行ったが、両方とも結晶を観察できなかった。以上の結果より、N 末端の translocation ドメイン (D1 - 321) のみのコンストラクトは結晶化が困難であると判断した。

2-4-1 考察 1：コリシン D の全体構造について

コリシン D の NTD を削ってコリシン D313 - 697 の結晶構造を決定した。一方、NTD のみ (ColD1 - 321) でも結晶化を試したが、結晶が現れなかった。結晶化条件のタンパク質濃度を 50 mg/mL まで上げて、また、温度を変化させても、結晶が得られなかった。なお、コリシン D の NTD-CD のコンストラクトについて調べた高橋一敏の結果により、CRD がないと CD が不安定になると分かっている[高橋一敏、博士論文]。

コリシン D とコリシン B の NTD は高い相同性を示す (Table 0-2) [Li W et al., 2015]。Fig. 2-15 に、コリシン D と B の NTD の 15 個アミノ酸の違いをピンク色で示した。コリシン D とコリシン B の両方ともグループ B コリシンであり、感受性菌の外膜に存在する FepA レセプターを利用して periplasm に侵入する。コリシン B の構造は二つのドメインに分けられ、両ドメインは一本の長いヘリックス (約 74 Å) で繋がれたダンベル状になっている (Fig. 2-15 の金色の領域)。

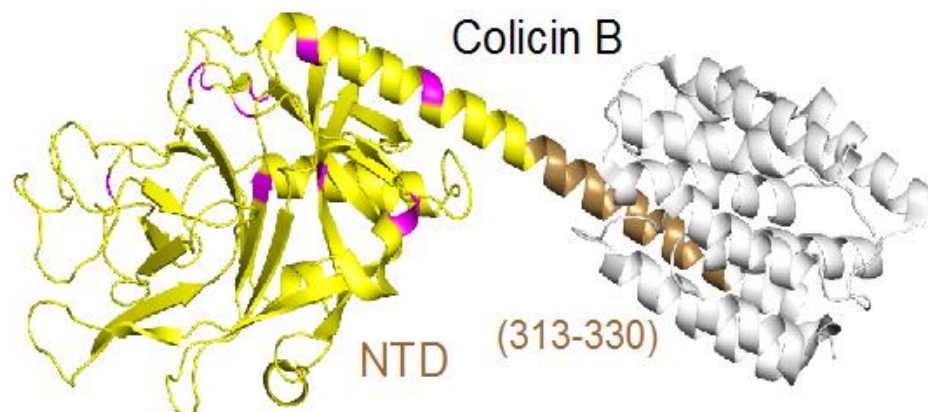


Fig. 2-15 コリシン B の全体構造 (PDB ID: 1RH1)

黄色の領域は N 末端の translocation ドメイン。金色の長いヘリックスはコリシン D の全体構造を構築するために重ね合わせた部分。灰色の領域はコリシン B の活性ドメインである。コリシン B の N 末端の translocation ドメインでコリシン D と異なる 15 個のアミノ酸はピンク色で示した。

コリシン D313 - 697 の結晶構造をみると、丁度 313 - 330 の領域も長いヘリックスを持っている (Fig. 2-10 の青色領域)。Swiss-Model サーバー[Biasini M et al., 2014]を用いてホモロジーモデリングしたコリシン D の構造 (global model quality estimation = 0.95) とコリシン B の 313 - 330 のヘリックスを重ね合わせて見た結果、18 個のアミノ酸配列の C_α RMSD は 0.262 Å であった (Fig. 2-16)。

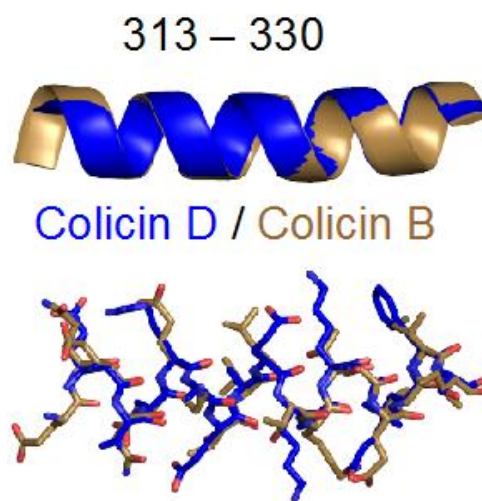


Fig. 2-16 コリシン D および B の長いヘリックス部分 (313 - 330) の重ね合わせ
18 個のアミノ酸の C_α RMSD は 0.262Å である。

コリシン D の NTD と CD-CRD は Ser291 - Ala332 を通して繋げた。更に、コリシン D595-ImmD の複合体結晶構造は (Fig. 0-7) 以前の研究 (PDB ID: 1TF) [Yajima S et al., 2004]によって得られている。以上の結果から、コリシン B の NTD およびコリシン D595-ImmD 複合体構造を利用して、コリシン D-ImmD の全体構造を推定できた (Fig. 2-17 の上側)。コリシン D-ImmD 複合体の全体構造は、3 つの領域 (NTD、CD、および CRD/ImmD) から構成された 150 Å の棒状構造となっている。そのうち、CD の中にあるピンク色で示した領域 (400 - 403、

558 - 565) およびオレンジ色で示した領域 (415 - 432) は、結晶構造でディスオーダーしていた領域である。

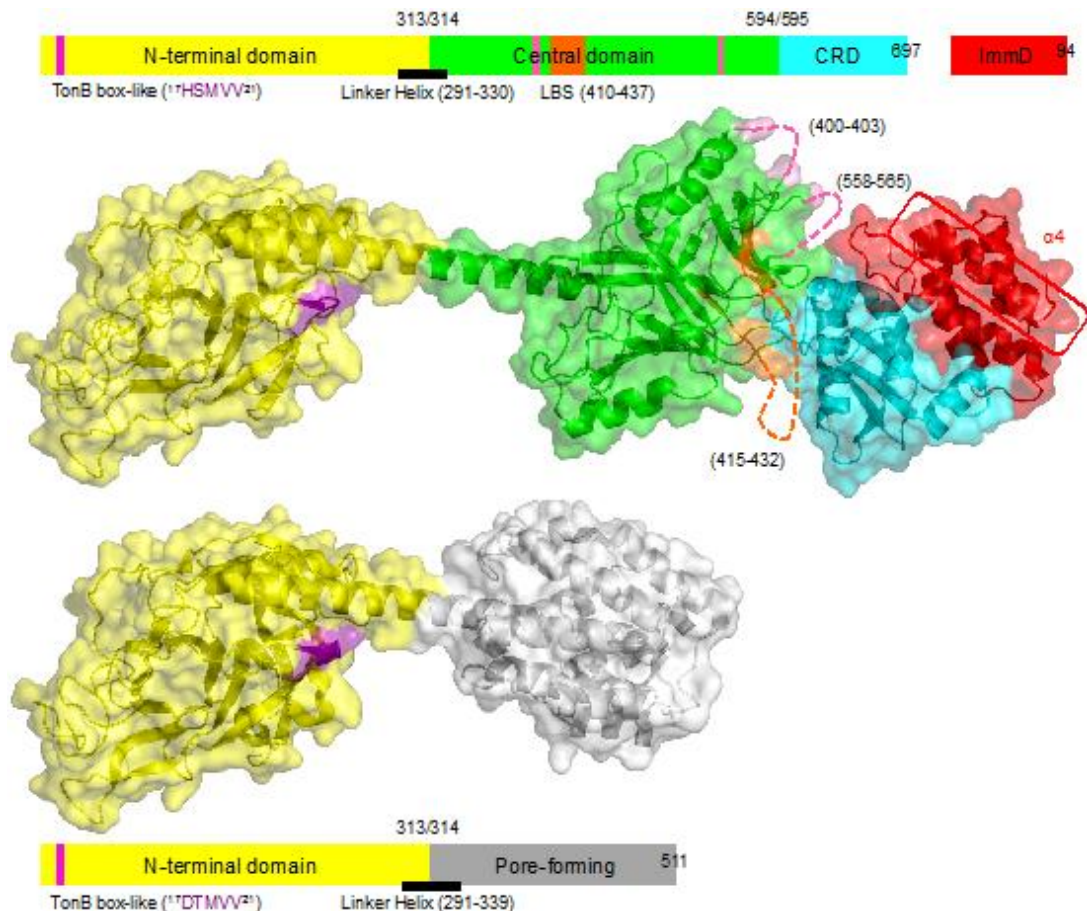


Fig. 2-17 コリシン D (上側) およびコリシン B (下側) の全体構造

コリシン D の黄色の領域は N 末端の translocation ドメインであり、マゼンタの部分は TonB box 配列 (17HSMVV21) である。緑色の領域は CD であり、オレンジ色の部分 LepB binding site (415 - 432 は disorder 領域) と予想されている領域である。他の 2 つの disorder 領域 (400 - 403 および 558 - 565) はピンク色で示した。シアン色の領域は感受性菌の tRNA を切断する機能を持つ活性ドメイン CRD であり、赤色の領域は免疫タンパク質と呼ばれる ImmD である。コリシン B は (PDB ID: 1RH1)、黄色の領域は N 末端の translocation ドメインであり、その紫色の部分は TonB box 配列 (17DTNVV21) である。Pore-forming ドメインを灰色で示した。

(Fig. 2-17) において、上側に示したのはコリシン D の全体構造であり、下側はコリシン B の全体構造である。黄色の領域は N 末端の translocation ドメイン

(NTD) であり、そのうちマゼンタ色の部分は TonB box 配列である。コリシン D の TonB box 配列は (¹⁷HSMVV²¹) であり、コリシン B の TonB box 配列は (¹⁷DTMVV²¹) である。緑色の領域は今回新しく決定したコリシン D の CD (314 - 594) であり、コリシン B はこのような領域を持っていない。コリシン B は感受性菌の内膜に穴を開けるタイプのコリシンであり、感受性菌の外膜を通過して periplasm に到達し、灰色の活性ドメインが菌体内に入ることなく作用できる。一方で、コリシン D はヌクレアーゼ型コリシンであり、感受性菌の外膜と内膜を通過して細胞質に到達してから作用する。従って図中で緑色で示した CD は感受性菌の内膜を通過するために重要な役割を果たすと考えられる。CD の中にはオレンジ色の領域 (410 - 437) は以前の研究より LepB binding site (LBS) と示唆されている[Mora L et al., 2015]。LBS については、次の (2-4-2 考察 2) で詳しく議論する。シアンで示した領域はコリシン D の活性ドメイン CRD であり、感受性菌の tRNA^{Arg} のアンチコドンループを切断する機能を持っている。赤色領域は 94 個アミノ酸配列から構成され、免疫タンパク質と呼ばれる ImmD であり、基質 tRNA の結合を阻害することで、CRD の tRNA 切断活性を阻害することが分かっている。以上の結果を総合し、コリシン D-ImmD の全体構造をホモロジーモデリングと立体構造アライメントにより推定した (Fig. 2-18)。

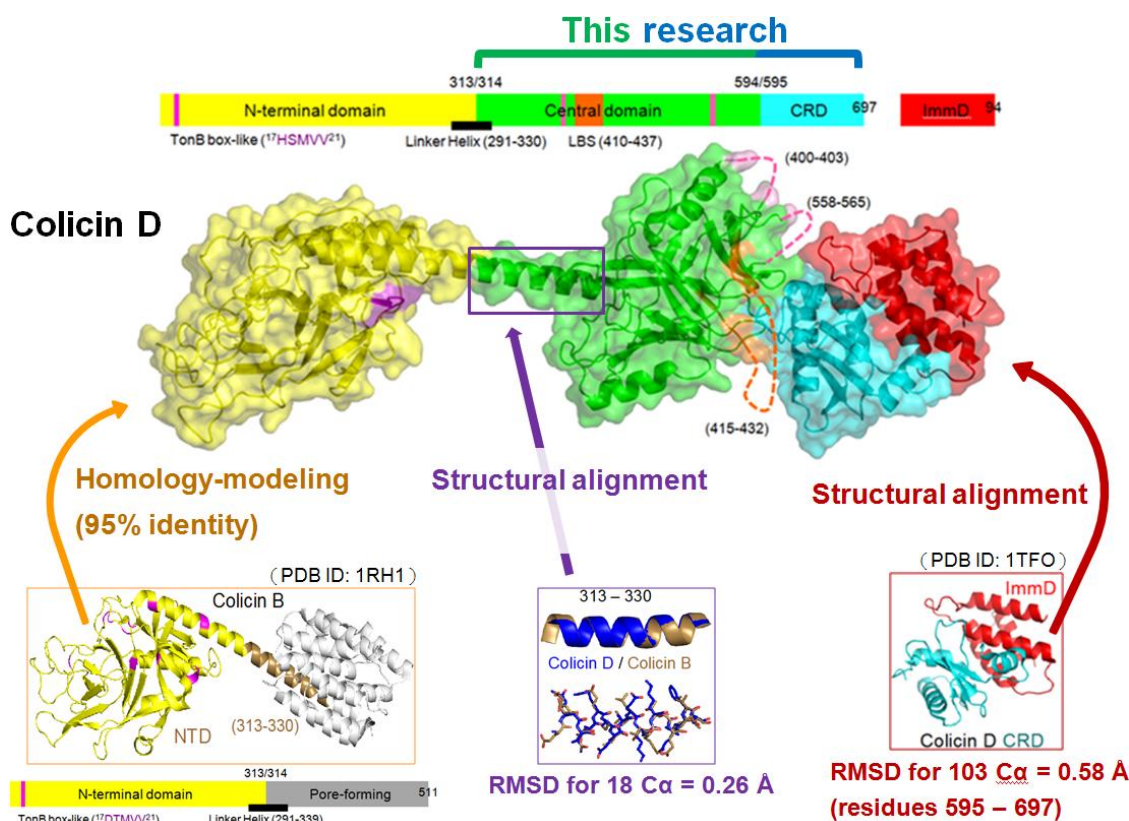


Fig. 2-18 ホモロジーモデリングと立体構造アライメントにより推定された
コリシン D-ImmD の全体構造

2-4-2 考察 2 : コリシン D の CD の構造と機能について

本研究の結晶構造から立体構造が新しく分かったドメイン（コリシン D のアミノ酸配列 331 から 594 までの領域）である CD の配列を用いて検索してみたところ、他の既知タンパク質の配列の中で 30%以上の配列同一性が見られるものがまったく存在していないことが分かった。ただし、CD の C 末端側（アミノ酸配列 452 - 590）は、S-type pyocin superfamily (pfam06958) に属する (Fig. 2-19)。また、コリシン D および B の N 末端ドメイン (translocation ドメイン) およびコリシン E 群の translocation ドメインも同じ S-type pyocin superfamily

(pfam06958) に属する。

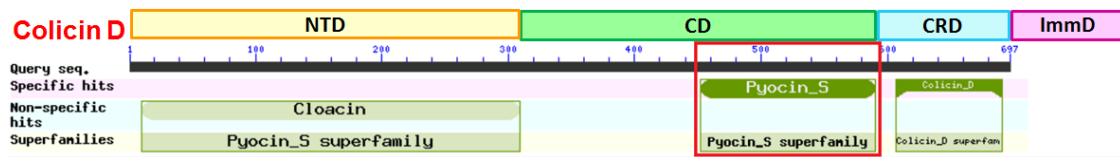


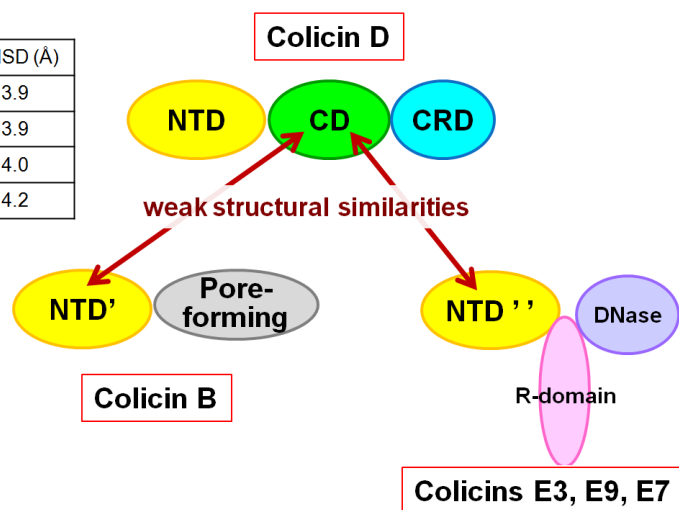
Fig. 2-19 コリシン D の CD (314 - 594) の C 末端側 (アミノ酸配列 452 - 590) は、S-type pyocin superfamily (pfam06958) に属する
 NTD (1 - 313) CD (314 - 594) CRD (595 - 697)

Dali サーバー [Holm L, Rosenstrom P, 2010] のデータベースで立体構造の類似性で検索してみた結果、コリシン D の CD (331 - 594) は弱い相同性 (Z score < 10) ながらも、コリシン E3, E7, E9 および B の N 末端ドメインに似ているが、アミノ酸配列の相同性はほぼ見られない (< 20%) (Table 2-2) ことが分かった。

Table 2-2 Dali サーバーによるコリシン D の CD の構造類似性検索

Database search (Dali server)

protein (domain)	Z score	RMSD (Å)
Colicin E3 (translocation domain)	9.8	3.9
Colicin E9 (translocation domain)	9.8	3.9
Colicin E7 (translocation domain)	9.1	4.0
Colicin B (translocation domain)	8.4	4.2



二次構造 matching-based データベース PDBeFold [Ball S.A et al., 2004] で検索してみた結果、同じようにコリシン D の CD (331 - 594) はコリシン E7 の translocation ドメイン (PDB ID: 2AXC の A 鎖; Q score = 0.186; RMSD = 3.2 Å)

に似ている。コリシン D の CD とコリシン B の N 末端ドメイン（translocation ドメイン）の構造を比較してみたところ（Fig. 2-20）、両方とも中央に 3 枚の β -sheets（青）を持っており、上に 1 つの α ヘリックス（シアン）がある。コリシン D（357 - 595）およびコリシン B（61 - 290）の構造も、弱いながら相同性があることが示された。

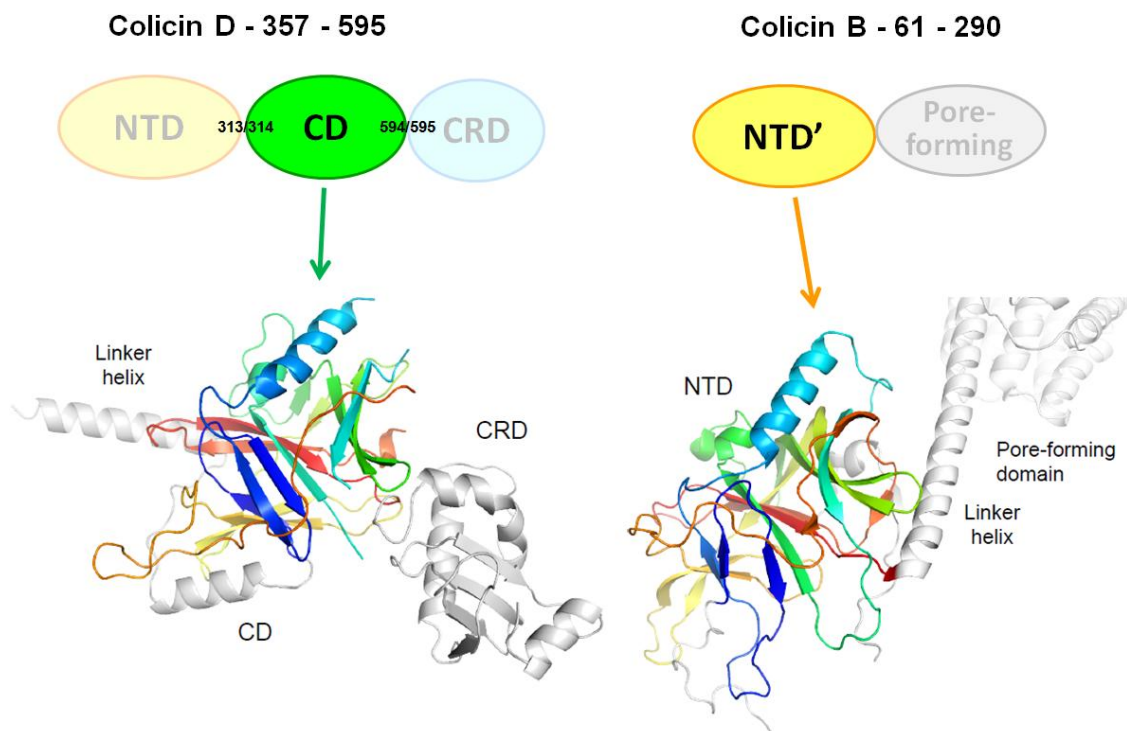


Fig. 2-20 コリシン D - CD (357 - 595) とコリシン B - NTD (61 - 290) 構造の相同性
立体構造で 2 次構造の対応関係が観察できる部分（169 残基）を青～赤で示した。両方とも中央に 3 枚の β -sheets（青）を持っており、上に 1 つの α ヘリックス（シアン）がある。

このように、コリシン D の CD は、他のコリシンで外膜の translocation を担う N 末端ドメインと構造の相同性があることから、それらと同様に、内膜の何らかのレセプター様の分子との相互作用を通じた translocation の機能を持つという予想と一致している。

CD の結晶構造でディスオーダーしていた 415 - 432 部分の意味を考えてみる (Fig. 2-21)。Mora らは、コリシン D の CD の立体構造が不明な段階で、CD の様々な領域を削って違う長さの変異体を作製し、変異体コリシン D と感受性菌の内膜にある LepB タンパク質との結合能力を調べた[Mora L et al., 2015]。コリシン D の 410 - 437 は LepB タンパク質と結合するときに必要な領域であり、この領域が LepB binding site (LBS) であると示唆されている。

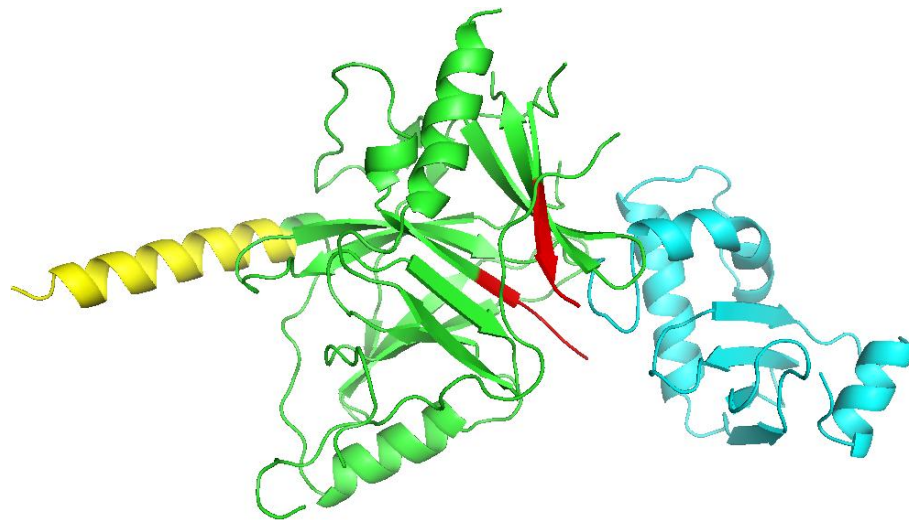


Fig. 2-21 Mora らによって示唆されたコリシン D の CD における LepB binding site
黄色の領域は N 末端 translocation ドメインの C 末端 (313 - 330)。緑色の領域は CD (331 - 594)。シアン色の領域 (595 - 697) は活性ドメイン (CRD)。CD 中の赤色の領域は、Mora らによって示唆された LepB binding site (LBS) (410 - 437) である[Mora L et al., 2015]。

結晶構造から見ると、(Fig. 2-21) に LBS (赤色) の構造は長いループになっていると考えられる。そして今回の結晶構造から、この LBS 領域は、ループ構造をとる部分としては 413 - 436 が正確だと考えられる (Fig. 2-22)。

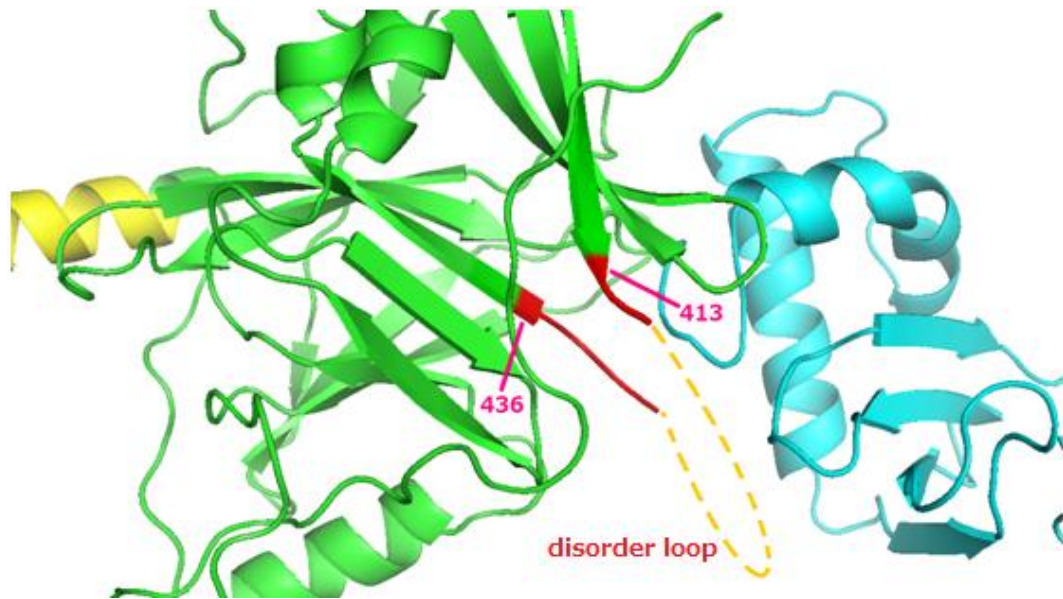


Fig. 2-22 コリシン D の CD の結晶構造から推定された LBS の領域
 本研究で得られた結晶構造より、コリシン D の LBS は 413 - 436 領域であり、
 長いループ状構造をとると推定された。

Mora らの 2015 年の研究により、感受性菌の内膜にある LepB タンパク質とコリシン D は 1:1 の比率で安定的な複合体構造を形成し、この結合はコリシン D を感受性菌の内膜を通過して細胞質に入るときに必要なことが示された[Mora L et al., 2015]。また、LepB タンパク質とコリシン D の結合は、コリシン D の活性ドメイン (591 - 697) と関連性がないことも分かった。更に LepB の BoxE と呼ばれる部分の変異体 (N274K) はコリシン D と結合できず、この変異体に対するコリシン D の殺菌活性もなくなった。LepB は大腸菌の内膜にある type I signal peptidase であり、特殊なセリンプロテアーゼで、活性中心は S91 と K146 の 2 つ組であることが知られている。LepB の立体構造より、N274 は活性中心ではなく、N274A 変異体は LepB のセリンプロテアーゼ活性に影響がないことが分かっている (Fig. 2-23)。また、点変異なので、LepB タンパク質

の全体構造には影響がないと考えられる。

UniProtKB - P00803 **Protein** | Signal peptidase I
Gene | lepB **Organism** | Escherichia coli (strain K12)

Pathology & Biotech'

Mutagenesis

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
Mutagenesis ¹	62	E → V: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	78	R → E, N or L: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	91	S → A: Loss of activity.			1
Mutagenesis ¹	125	H → N: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	128	R → Q: Small effect.			1
Mutagenesis ¹	130	D → A: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	144	Y → F: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	146	K → M, D, G or S: Loss of activity.			1
Mutagenesis ¹	147	R → Q: Small effect.			1
Mutagenesis ¹	154	D → A: Loss of activity.			1
Mutagenesis ¹	154	D → N: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	159	D → N: Small effect.			1
Mutagenesis ¹	171	C → A: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	177	C → A: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	236	H → N: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	269	Y → F: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	274	D → A: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	276	R → Q: Small effect.			1
Mutagenesis ¹	281	D → A: Indifferent.			1
Mutagenesis ¹	283	R → Q: Small effect.			1

Fig. 2-23 UniPort の検索結果。

N274A 変異体は LepB の serine プロテアーゼ活性に影響がないと報告されている[de Zamaroczy M et al., 2001]。

コリシン D は LepB タンパク質の活性中心ではなく、N274 の付近に結合するという事は、この結合は LepB のプロテアーゼ活性と関係なく、おそらく LepB タンパク質はコリシン D を「捕まえる」役割をしていると考えられる。Mora らは、コリシン D の CD の立体構造が不明な段階で、CD の様々な領域を削って変異体を作り、Far Western blotting を用いて変異体と LepB タンパク質との結合状況を調べた[Mora L et al., 2015]。その結果、CD に存在する特定の領域 (410 -

437) を持つ変異体コリシン D しか LepB と結合できないことが分かった。Mora らは、この領域 (410 - 437) を LepB binding site (LBS) と定義した。また、LBS の二つの変異体 A422D および G423D を調べたところ、コリシン D の殺菌活性が顕著に低下したことが分かった。しかし、変異体 A422V は野生型コリシン D と同等に殺菌活性を持っている結果が得られており、おそらく A422D で余分な negative charge が増え、コリシン D との結合を阻害したと考えられた。

さて、今回の結晶構造から、コリシン D の CD でディスオーダーして長いループ状構造をとる LBS 領域 (410 - 437 ではなく、ループ構造をとる部分としては 413 - 436 が正確だと考えられる) は、LepB タンパク質と結合するときに重要な役割を果たすことが分かった。Mora らは LBS の点変異により、コリシン D の活性への影響を調べている[Mora L et al., 2015]。そこで、この領域全体の重要性を調べるため、結晶構造で明らかになったループ状部分を全て削ることにした (Fig. 2-24)。

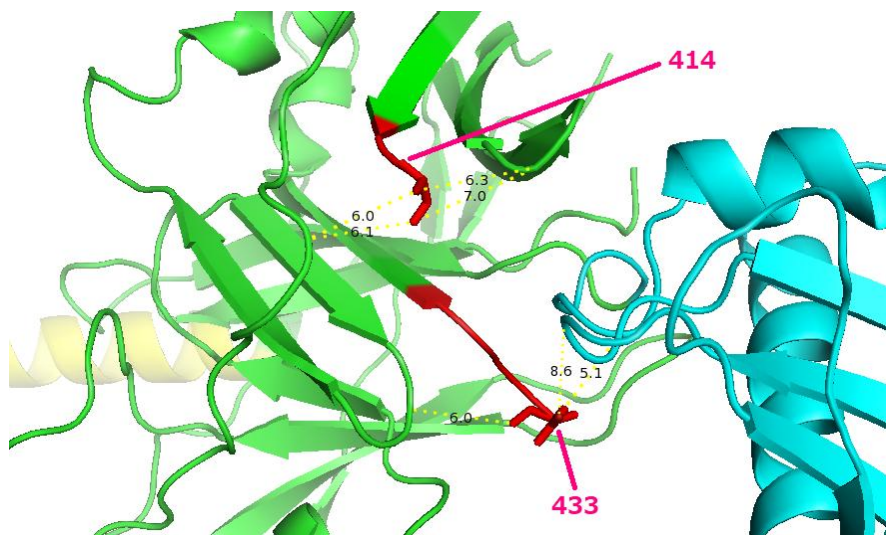


Fig. 2-24 コリシン D の CD にある LBS の拡大図
コリシン D の LBS に含まれる 414 や 433 番アミノ酸配列は
周囲の構造 (CD および CRD) と相互作用がある。

A414 および N433 は周囲の構造と相互作用があるように見えるため、コリシン D (Δ 415 - 432) の変異体を作製した。コリシン D413 - 436 の配列を以下に示す：

(413)GA - (415)LWFHSEEAGAGSDIVPGR(432) - NLEA(436)

A414 番から N433 番までの直線距離は約 15Å (\cong 4 個アミノ酸配列) であるため、Ala や制限酵素サイト BamHI (アミノ酸配列は Gly - Ser に相同する) を入れることにより 2 種類の長さのリンカー配列を入れた 2 つの変異体コリシン D プラスミドを作製し、大腸菌 W3110 株に形質転換をした。

(1) (413)GA-A-(G-S)-NLEA(436) (2) (413)GA-A-(G-S)-A-NLEA(436)

しかし、発現誘導してみたところ、SDS-PAGE の結果で両方の変異体とも大量発現バンド (約 73 kDa) が見えなかった (Fig. 2-25)。

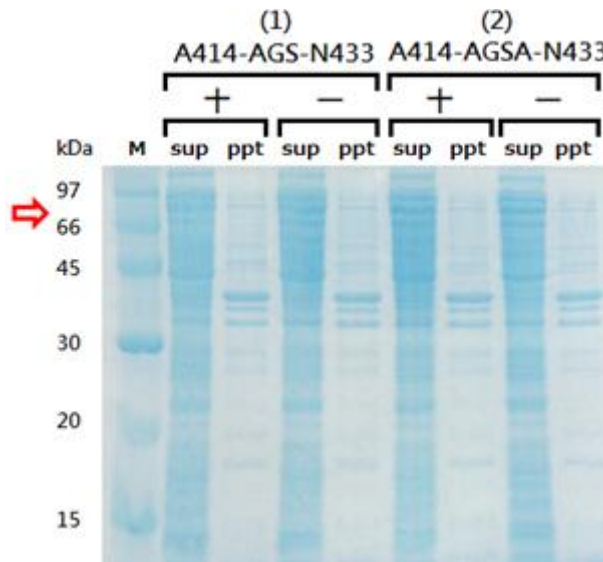


Fig. 2-25 コリシン D (Δ 415-432) 変異体の発現誘導実験の SDS-PAGE の結果
コリシン D (Δ 415-432) の変異体を作製し、発現誘導してみたところ、両方の変異体とも大量発現バンド (赤色矢印で示した、約 73 kDa) が見えなかった。

(1) (413)GA-A-(G-S)-NLEA(436)。 (2) (413)GA-A-(G-S)-A-NLEA(436)。

十 は発現誘導あり (+ mitomycin C)。 ー は発現誘導なし (- mitomycin C)。

sup は破碎して遠心した上清液。 ppt は破碎して遠心した沈殿。 M はマーカー。

コリシン D (Δ415 - 432) 変異体のタンパク質が発現できない理由は、長いループ状構造 (413 - 436) はコリシン D の CD-CRD 構造を安定させる効果も持っている可能性が考えられた。コリシン D の立体構造から見ると、413 - 436 はちょうど CD および CRD の間に挟まれる (Fig. 2-22)。この長いループ状構造を削ると、CD-CRD 構造が不安定になるか、CD-CRD 構造が上手く folding できないと示唆された。

また、LepB とコリシン D との non-catalytic な結合は、コリシンの中でも特殊だと考えられる。Chauleau らの研究により、*in vitro* の実験から、DNase タイプのコリシン E2、RNase タイプのコリシン E3、および内膜に穴を開けるタイプコリシン B のいずれも LepB と結合できないことが示唆されており、それらの *in vivo* 殺菌活性は LepB とは特に関連性がないと考えられた[Chauleau M et al., 2011]。

2-4-3 考察 3 : コリシン D の感受性菌への侵入経路について - 外膜の通過

全長コリシン D の構造を用いて、感受性菌への侵入経路を推定した。まずは感受性菌の外膜を通過することに関して説明する。コリシン D は感受性菌の外膜のレセプター FepA に結合し、内膜の TonB システム (TonB, ExbB, ExbD) を経由することで periplasm に侵入する (Fig. 2-26)。Devanathan らの研究によると、コリシン B は FepA の barrel 構造を通過して periplasm に入ることが推定されている[Devanathan S, Postle K, 2007]。FepA の barrel 構造はトンネルに似ており、初期状態においてその内側にプラグドメインと呼ばれるドメイン

(約 150 アミノ酸配列) がそのトンネルを塞いでいる[Buchanan S.K et al., 1999]。プラグドメインには TonB box と呼ばれる配列 (アミノ酸配列 12 -18) があり、内膜の TonB システムと相互作用できる。

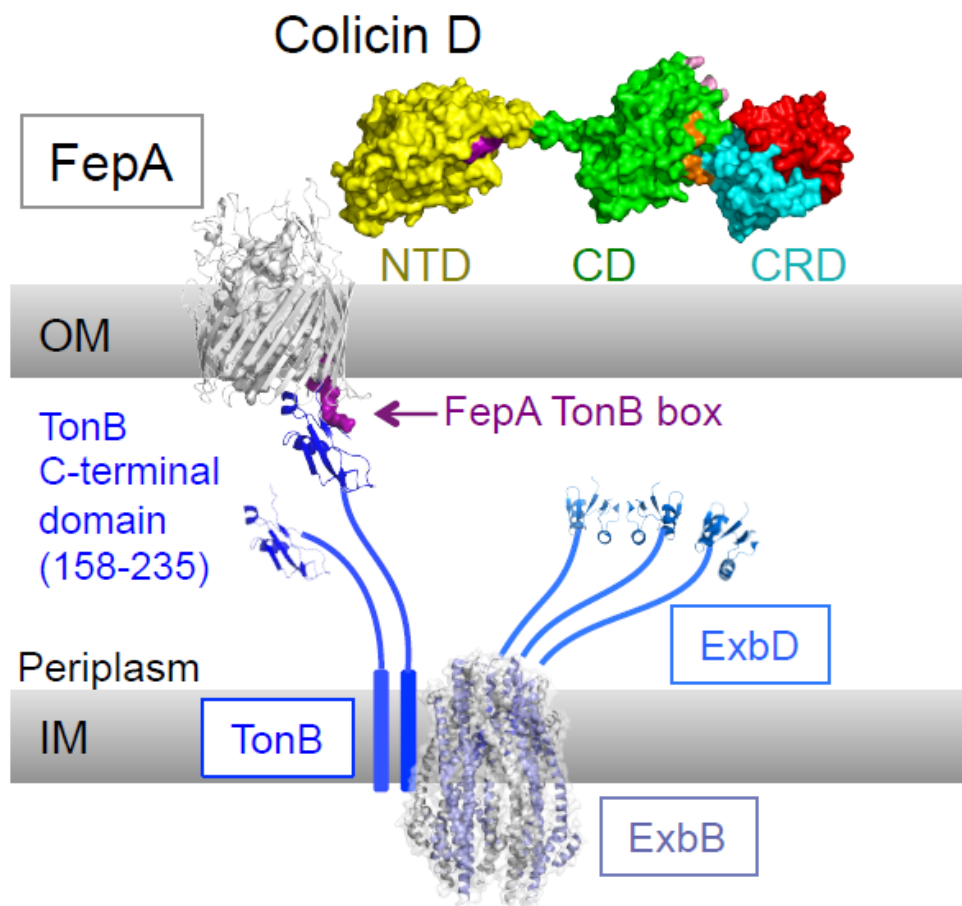


Fig. 2-26 コリシン D の感受性菌の外内膜通過の模式図

コリシン D は、外膜の鉄取込みに関わるレセプターFepA に結合し、内膜の TonB システム (TonB, ExbB, ExbD) を経由することで periplasm に入る。

FepA の PDB ID: 1FEP

Ton システムの PDB ID: 5ZFP

[Chang JW et al., 2018]

コリシン B の N 末端ドメインは、まず、FepA の globular ドメインに結合したのち、そのトンネルに入る[Ma L et al., 1999]。FepA の通路はやや細く、コ

リシン B の N 末端ドメインはその通路より大きい。そのため、コリシン B の N 末端ドメインが完全に FepA のトンネルに入るには、部分的に unfolding する必要があると考えられている (Fig. 2-27)。感受性菌の内膜の TonB は、コリシン B の NTD にある TonB box 配列 ($^{17}\text{DTMVV}^{21}$) に結合し、TonB システムの作用 (proton motive force, PMF が driving force となる) でコリシン B を感受性菌の periplasm に引き込む。コリシン D の N 末端ドメインは、コリシン B の N 末端ドメインと非常に高い相同性があり、TonB box 配列 ($^{17}\text{HSMVV}^{21}$) (Fig. 2-17) が TonB と結合することで、コリシン B と同じ方法や経路で感受性菌の periplasm に入ると考えられている。

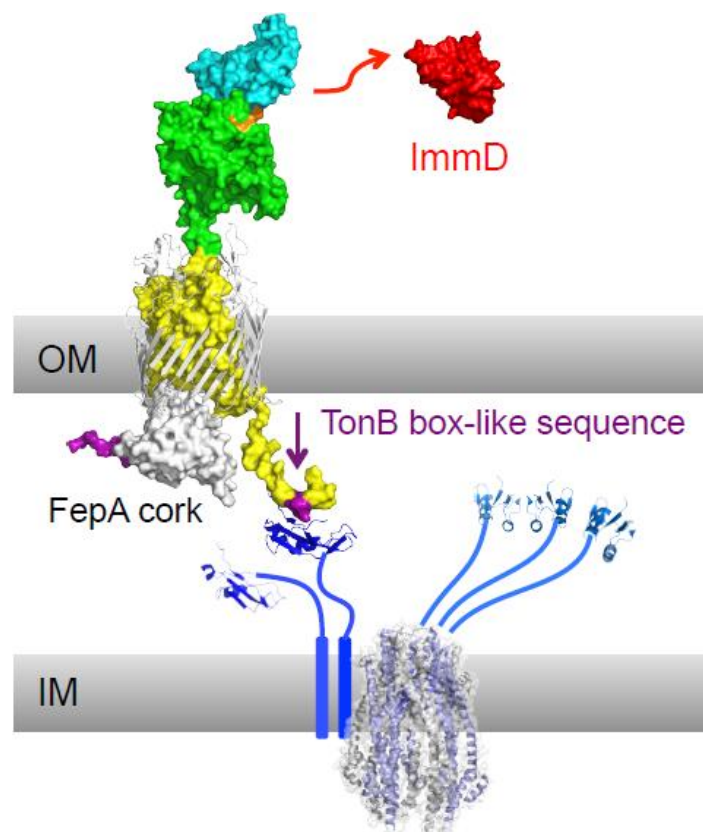


Fig. 2-27 コリシン D は感受性菌の外膜の FepA タンパク質内部のトンネルに入り、内膜の TonB システム (TonB, ExbB, ExbD) を利用することで、periplasm に入る。 [Chang JW et al., 2018]

Ton B の C 末端ドメインに点変異 (R158S 或いは P161L) を導入すると、コリシン D の感染毒性が失われたが、TonB box-like 配列をサプレッサー変異する (HTMVV 或いは HSIVV) ことにより、コリシン D の感染毒性が回復された [Mora L et al., 2005]。以上の結果から、コリシン D および B の TonB box 配列は、大腸菌の TonB システムと直接相互作用することが示された。大腸菌の TonB システムは 3 つの膜タンパク質 (TonB、ExbB、および ExbD) から構成され [Celia, H et al., 2016]、内膜の PMF は TonB システムを経由することで、外膜を通過するタンパク質等に伝達される。ImmD は、感受性菌の外膜に伝達された PMF を利用することで、コリシン D の CRD から解離するという可能性が考えられている。

大腸菌および近縁種のコリシンのシステムとよく似ている translocation 経路を持つバクテリオシンとして *Pseudomonas aeruginosa* 由来の pyocin S2 がある。Pyocin には不溶性の R 型および F 型と、可溶性の S 型がある。S 型 pyocin はコリシンと部分相同性がある。R 型と F 型の pyocin は、bacteriophage の尾部に似た構造を持っており、phage の溶菌能力と関連すると考えられている。Pyocin S2 はヌクレアーゼ型バクテリオシンであり、その全体構造はまだ報告されていないが、感受性菌の内膜を通過して DNA を切断する DNase 活性を持っている。White らの研究では、pyocin S2 (pyoS2) の N 末端ドメインと *Pseudomonas aeruginosa* の鉄 transporter FpvAI との複合体結晶構造が決定され、pyoS2 の N 末端ドメインは FpvAI を利用し、PMF で *P. aeruginosa* の外膜を通過する機構が提唱されている (Fig. 2-28) [White P et al., 2017]。

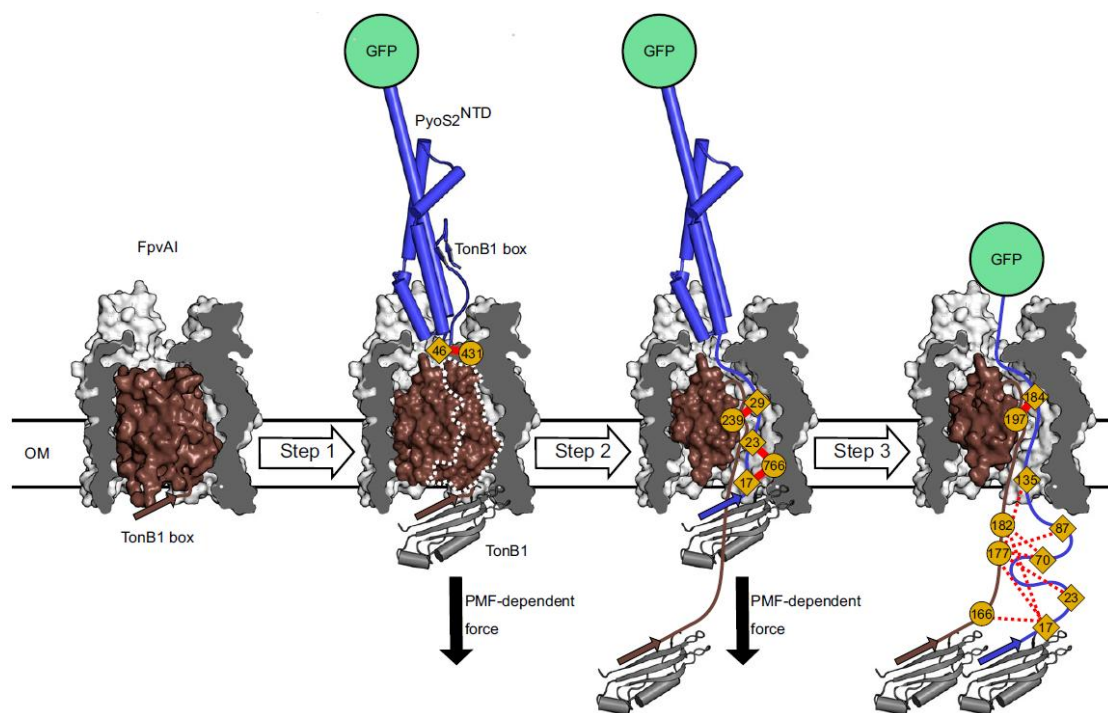


Fig. 2-28 Pyocin S2 (pyoS2) の N 末端ドメインは、*Pseudomonas aeruginosa* の外膜にある鉄 transporter FpvAI を利用し、PMF で外膜を通過して periplasm に入る。 [White P et al., 2017]から転載

FpvAI は *P. aeruginosa* の TonB-dependent transporter であり、内膜にある TonB1 の PMF を利用し、siderophore ferripyoverdine (Fe-Pvd) を輸送する。その結晶構造によると [White P et al., 2017]、pyoS2 の N 末端ドメイン (pyoS2^{NTD}) は FpvAI に結合することにより、pyocin は本来の基質である Fe-Pvd の結合を mimic すると考えられる。PyoS2^{NTD} は、PMF を利用して FpvAI のプラグドメインの一部を unfolding し、それで生じたトンネルにより、*P. aeruginosa* の外膜を通過して periplasm に入る。*P. aeruginosa* の鉄の transporter である FpvAI は、*E. coli* の鉄の transporter である FepA と似ており、両方とも 22-stranded β -barrel 構造を持っている。FpvAI も FepA も、その中心はトンネル構造であり、その中

に球状のプラグドメインを持つ。*P. aeruginosa* の内膜の TonB1 (*E. coli* の内膜の TonB のホモログ) と結合した場合に、TonB システムの PMF を利用して Fe を輸送すると考えられる。

PyoS2^{NTD} は 5 つの α ヘリックスで構成され、N 末端の 35 番から 45 番までの 11 個のアミノ酸は、proline-rich region (PRR) であり、FpvAI のプラグドメインに接触すると考えられている。更に、UV-inducible cross-link の実験により、pyoS2^{NTD} は FpvAI を通過するときに、FpvAI の中央にあるプラグドメインの一部が外れて pyoS2^{NTD} が unfolding し、barrel ドメインの穴を通過することが明らかになった[White P et al., 2017]。しかし、コリシン B および D の N 末端ドメインは比較的安定な構造であり、FepA を通過するときには、pyoS2^{NTD} のように大きく unfolding するとは考えにくい。コリシン D および B は pyoS2 とは異なり、その N 末端ドメインは部分的に unfolding しつつ、完全に FepA のトンネルに入ると予想されている。

2-4-4 考察 4 : コリシン D の感受性菌への侵入経路について - 内膜の通過

コリシン B は感受性菌の内膜に穴を開けるタイプの毒素であり、感受性菌の外膜を通過して periplasm に入れば、活性ドメインが作用できると推定されている。一方で、コリシン D は感受性菌の tRNA^{Arg} を切断するヌクレアーゼタイプの毒素であり、感受性菌の内膜を通過して細胞質に到達しないと作用できない。de Zamaroczy らの研究により、大腸菌の内膜にある leader peptidase LepB の変異株 (N274K) がコリシン D 耐性を示すことが分かっている[de Zamaroczy

M et al., 2001]。N274 は LepB の活性中心に近いが、LepB 変異株 (N274K) の leader peptidase 活性は失われずに、分泌性タンパク質のプロセッシング機能を保っている。そして Mora らの研究により、コリシン D の CD は、感受性菌の内膜を通過する役割を果たすと予想された[Mora L et al., 2015]。感受性菌の内膜の LepB タンパク質は、コリシン D の CD の長いループ状構造 (413 - 436) に結合し、コリシン D を「捕まえる」役割を担当すると考えられる。更に、最終的に細胞質に到達して tRNA を切断するのは CRD のみである。Chauleau らの研究により、細胞質で検出されたコリシン D の部分的な領域は、アミノ酸配列 590 - 697 であることが分かった[Chauleau M et al., 2011]。そこでは、FtsH の作用が必須だと考えられている (Fig. 2-29) 。FtsH プロテアーゼは ATP 依存性メタロプロテアーゼ (AAA+ プロテアーゼ) であり、損傷を受けたタンパク質のアミノ酸末端を認識し、ATP 依存的に損傷したタンパク質を分解することが知られている[Erzberger JP, Berger JM, 2006]。FtsH は ATP 依存性プロテアーゼの中で唯一の膜タンパク質であり、熱ショック転写因子 σ^{32} を特異的に分解することも明らかにされた[Guisbert E et al., 2008]。更に、Walker らの研究により、全ての Ton および Tol システムを利用したヌクレアーゼ型コリシンは、FtsH のペプチダーゼ活性を悪用し、感受性菌の内膜を通過すると考えられている[Walker D et al., 2007]。

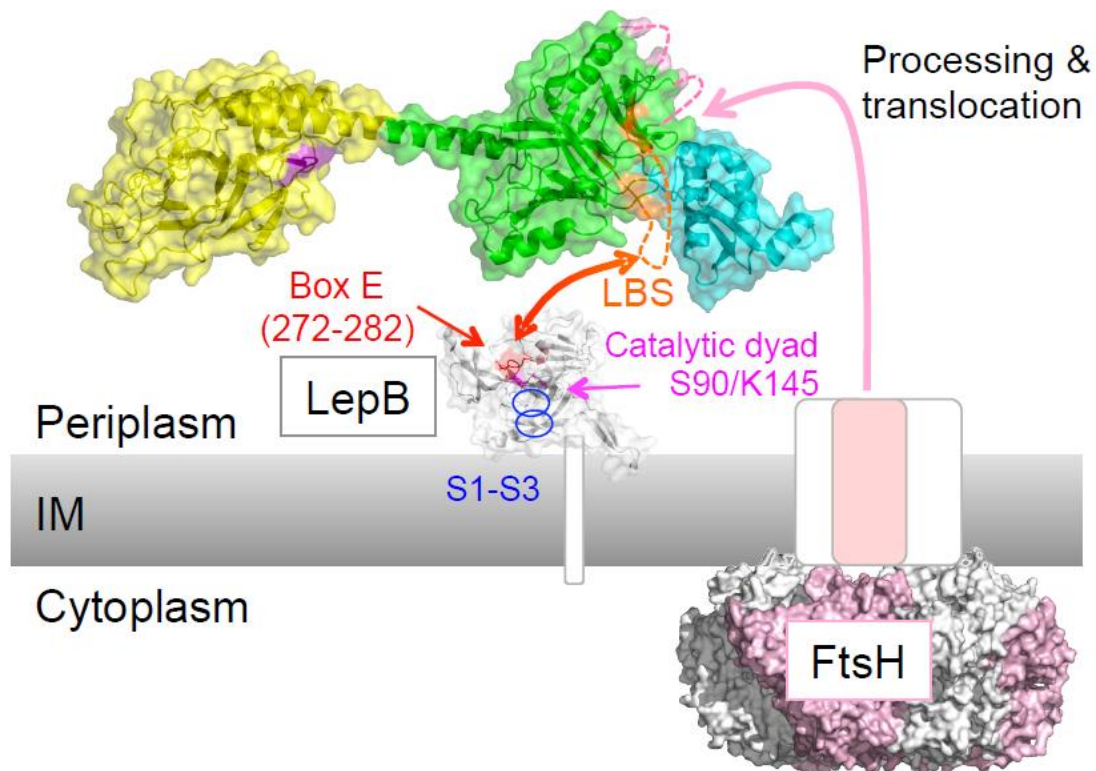


Fig. 2-29 感受性菌の periplasm に入ったコリシン D は、感受性菌の内膜にある 2 つのタンパク質 (LepB、FtsH) と相互作用する

コリシン D の CD にある長いループ状構造 (413 - 436) は LepB に捕まえられる。そこで、AAA+ プロテアーゼ FtsH のプロテアーゼ機能により、CD と CRD の間 (589 - 590) が切断されると推定されている。コリシン D の CD にあるオレンジ色領域 (413 - 436、ディスオーダー領域 415 - 432) は LBS だと考えられている。LepB は type I signal peptidase である。BoxE (272 - 282) (赤字) は、コリシン D の LBS と結合する場所である。LepB の青線で囲んだ場所は、分泌タンパク質基質のシグナル部分が結合する S1 - S3 である。セリンプロテアーゼの活性中心 (S91、K146) はピンクで示した。FtsH の PDB ID: 2DI4 [Chang JW et al., 2018]

しかし、先ほど述べたように CD にはいくつかの分解されやすい領域がある。また、コリシン D の全体構造から見ると 590 番配列の場所は CD の内部に存在しており、 β シートの末端でもあるために、そこで切断されるためには、部分的な unfolding が必要である。Mora らの生化学実験の結果[Mora L et al., 2015]

および本研究で明らかになった CD-CRD の結晶構造により、シグナルペプチダーゼ LepB と LBS の相互作用は、CD を部分的に unfolding して、589 - 590 のペプチド結合を露出させるのに必要であると推定される (Fig. 2-30)。FtsH の作用は、コリシン D の 590 番を切断し、CRD を FtsH 六量体のトンネル構造を通過させて細胞質に引き入れると推定される。

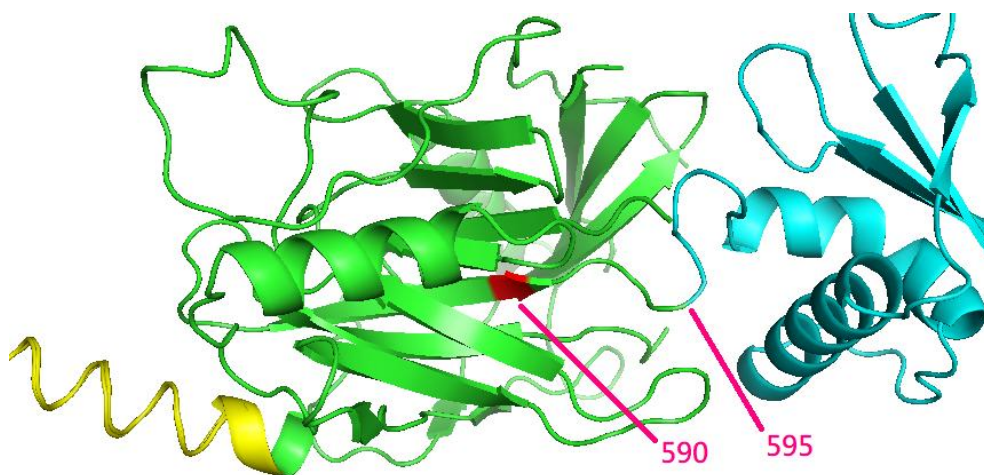


Fig. 2-30 コリシン D の 590 番および 595 番配列の場所
シグナルペプチダーゼ LepB と LBS の相互作用は、CD を部分的に unfolding して、FtsH により切断される 589 - 590 のペプチド結合を露出させるのに必要であると推定されている。

2-4-5 考察 5 : コリシン D の感受性菌への侵入経路について - 全体の模式図

コリシン D の感受性菌への侵入経路の全体的な模式図を (Fig. 2-31) に示した。

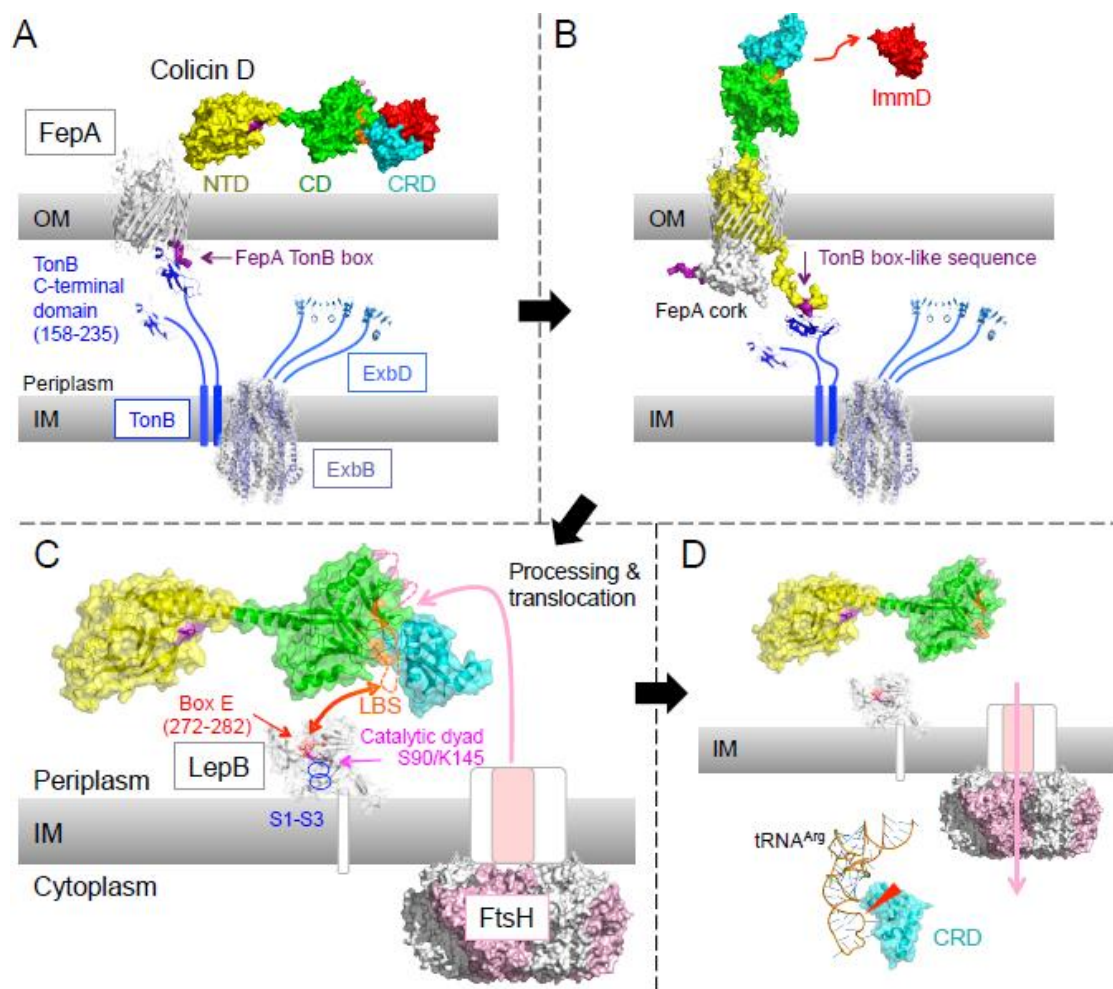


Fig 2-31 コリシン D の感受性菌への侵入経路の全体模式図
 A、B、C、D の拡大図は、Fig 2-26、27、29、32 にそれぞれ示した。
 [Chang JW et al., 2018]

まず、(2-4-3 考察 3) に述べたように、コリシン D の N 末端ドメインは感受性菌の外膜の FepA レセプターに結合し、FepA タンパク質のトンネルを通過する (Fig. 2-26)。コリシン D の N 末端の translocation ドメインは FepA タンパク質のトンネルに入り、その TonB box 配列 ($^{17}\text{HSMVV}^{21}$) は内膜の TonB タンパク質に結合し、TonB システム (TonB, ExbB, ExbD) の PMF を利用することで、periplasm に入る。元々 FepA タンパク質のトンネルに入っているプラ

グドメインは、コリシン D に押され、periplasm に出てくる。コリシン D の免疫タンパク質 ImmD は、TonB システムの PMF によってコリシン D の CRD と分離し、感受性菌の膜外に残ると示唆されている (Fig. 2-27)。

ImmD が除かれたコリシン D は感受性菌の periplasm に入り、CD にある長いループ状構造 (413 - 436) を介して LepB に捕まえられる (Fig. 2-29)。 (Fig. 2-29) で LepB タンパク質の中央のピンクの部分は、type I signal peptidase として機能するセリンプロテアーゼの活性中心 (S91 と K146) である。コリシン D の CD にある長いループ状構造 (オレンジ色で示した領域 413 - 436, ディスオーダー領域 415 - 432 も含まれる) は、LepB タンパク質の活性中心ではない BoxE (272 - 282) (赤色の領域) に結合する [Mora L et al., 2015]。

LepB に捕えられたコリシン D は、AAA+ プロテアーゼ FtsH のプロテアーゼ機能により、CD と CRD の間 (589 - 590) で切断され、FtsH を經由することで感受性菌の内膜を通過する (Fig. 2-29, 2-32)。グループ A と B のいずれであっても、ヌクレアーゼ型コリシンは、感受性菌の内膜を通過するときに FtsH が必須だと考えられている。一方で、感受性菌の内膜に穴を開けるタイプのコリシン (pore-forming colicin) は、FtsH の作用が必須ではないことが分かっている [Walker D et al., 2007]。しかし、FtsH による内膜通過の詳しい機構についてはまだ分かっていない。感受性菌の細胞質に到達するコリシン D の CRD は、tRNA^{Arg} のアンチコドンループにある、38 と 39 の間の 3' 末端を切断して、タンパク質の翻訳を阻害する (Fig. 2-32) [Tomita K et al., 2000]。

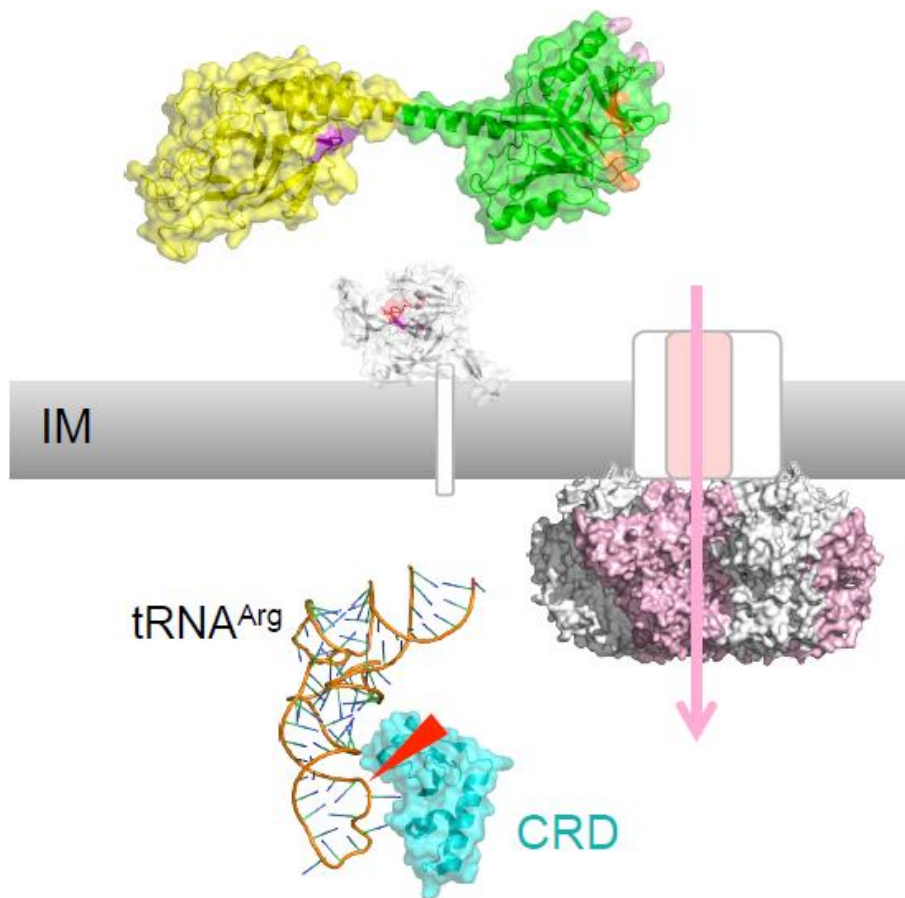


Fig. 2-32 AAA+ プロテアーゼ FtsH のプロテアーゼ機能によって切断された CRD は、FtsH タンパク質を経由することで感受性菌の内膜を通過し、細胞質に入って tRNA^{Arg} を切断すると考えられる（切断部位を赤矢印で示した）。
[Chang JW et al., 2018]

2-4-6 考察 6：コリシン D の CD の構造、および各種のタンパク質との相互作用が予想される領域について

本研究で、コリシン D の CD + CRD ドメインの結晶構造を決定した。そこから、コリシン D の全体構造を構築し、感受性大腸菌の細胞内に入る translocation 経路を提案した。コリシン D の CD（約 280 アミノ酸配列）は比較的特殊な存在であり、今まで発見された他の 20 種類以上のコリシンには含ま

れておらず[Cascales E et al., 2007]、その立体構造も長い間分かっていなかった [de Zamaroczy M, Buckingham RH, 2002]。de Zamaroczy のグループは、これまでの約 20 年間、コリシン D の CD が感受性大腸菌の内膜を通過する際に果たす役割について調べてきた[de Zamaroczy M, Mora L, 2012]。その結果、TonB や ImmD、および LepB と相互作用がある領域やサイトが CD にあると予想している[Mora L et al., 2008] [Mora L et al., 2015]。ここで、CD の結晶構造に、Mora らによって TonB や ImmD、および LepB と相互作用があると予想された領域やサイトをマッピングしてみた (Fig. 2-33)。

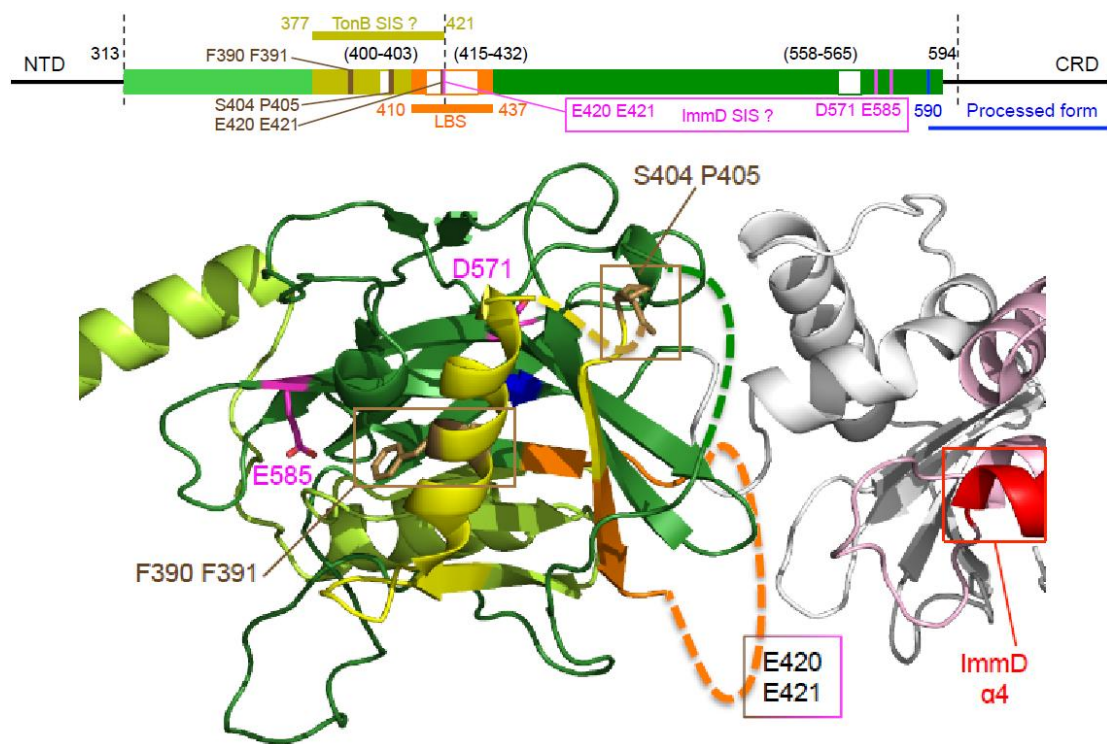


Fig. 2-33 コリシン D の CD の結晶構造に、Mora らにより TonB や ImmD、および LepB と相互作用があると予想された領域やサイトをマッピングした。SIS は second interaction site の略である。

グループ B コリシンでは、NTD にある 5 つのアミノ酸 (TonB box-like) 配

列および 8 番目のアミノ酸配列（コリシン D の場合は Gly）の部分が、major interaction site (MIS)として感受性大腸菌の内膜にある TonB と相互作用することが知られている。感受性大腸菌の Ton B の C 末端ドメインに点変異（R158S 或いは P161L）を導入すると、コリシン D の感染毒性が失われたが、TonB box-like 配列をサプレッサー変異する（HTMVV 或いは HSIVV）ことで、その感染毒性は回復する[Braun V et al., 2002] [Mora L et al., 2008] [Mora L et al., 2005]。更に、Mora らの研究により、コリシン D の CD にある 377 - 421 領域は、TonB との second interaction site (SIS)だと示唆された[Mora L et al., 2008]。コリシン D の 3 つの二重変異体（F390C/F391Y、S404R/P405D、E420R/E421R）は、TonB box-like 配列をサプレッサー変異した（HTMVV 或いは HSIVV）場合でも、感受性大腸菌の Ton B の C 末端ドメインに点変異をした株に対し、コリシン D の感染毒性が回復できなかった（Fig. 2-34）。

コリシンDのCDで予想されたTonBとのSISをFig. 2-33で黄色で示した。1本の β -strandの半分、1本の α ヘリックス、そして短いdisordered領域（400 - 403）、更にもう1つの β -strand、および長いdisordered領域の半分（410 - 421）が含まれている。上記の3つの二重変異株の位置は、茶色で示した。Phe390/Phe391はCDの内側にあり、Ser404/Pro405およびGlu420/Glu421はdisordered領域の付近に存在する。配列385 - 398の α ヘリックスはCDの表面にあるが、MoraらによってTonBとのSISであると予想された377 - 421領域は、TonBと相互作用するようには見えず、本研究で得られたCDの立体構造からは否定的な結果が得られた。

コリシン D の CRD-ImmD 結晶構造によると、ImmD は CRD の片側と結合しており、ImmD は基質 tRNA の形を擬態することで、強く（電荷および形の相補性で）結合しており、ここが MIS である[Yajima S et al., 2004] [Graille M et al., 2004]。ところが、Mora らの研究によれば、CD には ImmD にも SIS があることが示唆された[Mora L et al., 2008]。例えば、3 種類の変異株(D571A や E585A、E420R/E421R) は ImmD との免疫性を失い、CD は ImmD の $\alpha 4$ ヘリックスと相互作用する可能性があるとして報告されている。

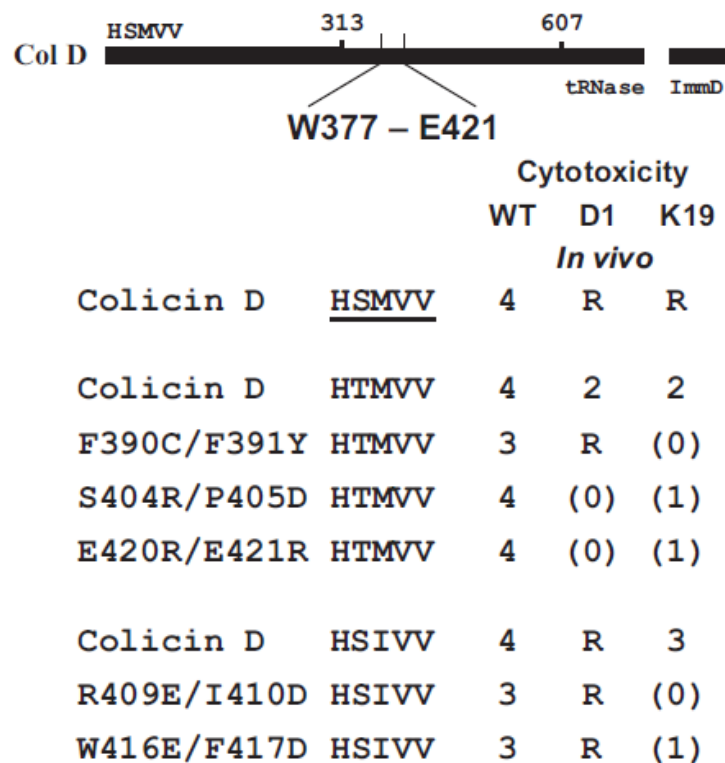


Fig. 2-34 コリシン D の TonB box-like 配列および 377 - 421 領域のアミノ酸残基を点変異することにより、コリシン D の感染毒性について調べた結果
野生型コリシン D の TonB box-like 配列は HSMVV である。WT は野生型の、D1 と K19 は変異型 TonB の感受性大腸菌である。コリシン D の感染毒性に耐性を持つことを R で、感染毒性への感受性強度を 0（弱い）から 4（強い）までで示した。
[Mora L et al., 2008]から転載

しかし、(Fig. 2-33) に赤色で示した $\alpha 4$ ヘリックスは、CRD と ImmD の MIS が相互作用している領域とは反対側にある。(Fig. 2-17) の上で示した全長のコリシン D 構造から見ると、CD と CRD-ImmD ヘテロダイマー複合体部分は個別のドメインになっており、両者の間には構造的相互作用がみられない。CD に存在する 2 つの disordered 領域 (400 - 403 や 558 - 565) は 4 個または 8 個のアミノ酸しかないため、長さが短く、ImmD の $\alpha 4$ ヘリックスには届かない。Fig. 2-33 でマゼンタで示した Asp571 と Glu585 は、CD の内部にある β -strand の中央部に存在し、Glu420 と Glu421 は、オレンジ色で示した長い disordered 領域 (415 - 432、18 個アミノ酸配列) の中央にある。この長い disordered 領域は、ImmD にある $\alpha 4$ ヘリックスに届く可能性があるが、結論としては、本実験で明らかになった結晶構造 (Fig. 2-17) からは、CD には ImmD との SIS が存在するとは考えにくい。Mora らの研究では、4 段階に連続希釈したコリシン D を用いて、halo テストにより感受性大腸菌細胞への毒性を評価した結果をもとに、コリシン D の CD に TonB および ImmD との SISs が存在することが推定されている[Mora L et al., 2008]。彼らの研究は、「CD 対 ImmD」の相互作用評価の大前提として *immD* 遺伝子に変異していないため、*immD* の発現レベルは変化しないと仮定した。しかし、ImmD には翻訳開始シグナルがなく、*colD* と translational-coupling が働いていると考えられる。上流 ORF の変異は *immD* の発現量に大きく影響する可能性は高く、ImmD による tRNA を切断する活性を抑制する能力が失われる可能性もある。以上のことから、CD と ImmD との相互作用 (SIS) があるという結論も、実験結果そのものが根拠が薄いと考えられる。

一方で、各種の実験から、コリシン D が感受性大腸菌細胞の内膜を通過する時に、LepB-FtsH の作用が必須だと証明されている (Fig. 2-29) [de Zamaroczy M, Mora L, 2012]。また、全ての Ton および Tol システムを利用するヌクレアーゼ型コリシンは、FtsH のタンパク質分解機能を悪用し、感受性菌の内膜を通過すると考えられている [Walker D et al., 2007]。LepB とコリシン D との non-catalytic な結合は、コリシンの中でも特例的であると考えられる。In vitro の実験では、DNase タイプのコリシン E2 も、RNase タイプのコリシン E3 も、および内膜に穴を開けるタイプのコリシン B も LepB と結合できないことが分かっている [de Zamaroczy M et al., 2001]。LepB は特殊なセリンプロテアーゼであり、活性中心は S91 と K146 であるが、その触媒活性はコリシン D の侵入やプロセッシングには関係しない [Chauleau M et al., 2011]。Mora らの研究によると、感受性菌の内膜の LepB タンパク質とコリシン D の CD の LepB binding site (LBS、配列 410 - 437、本研究の結晶構造により、正確な LBS は 413 - 436 領域だと推定された) は in vitro で 1:1 の比率で安定的な複合体構造を形成し、この結合はコリシン D が感受性菌の内膜を通過して細胞質に入るときに必要なと考えられている [Mora L et al., 2015]。更に、LepB の変異株を用いた実験により、C 末端付近の Box E (配列 272 - 282) と呼ばれる保存された配列 [Klenotic PA et al., 2000] が、コリシン D の LBS と相互作用することが示された [Mora L et al., 2015]。LepB の変異株 Asn274 → Ala274 と Asn277 → Lys277 は、コリシン D との相互作用が抑制された。特に感受性大腸菌細胞の LepB 変異株 N274K は、コリシン D への感受性を失ったことが分かっている [de Zamaroczy M et al., 2001]。一

方で、LepB の触媒活性が失われた K145A 変異株は、野生型 LepB 株と同等の コリシン D と強い結合能力を保持していた。そして、コリシン D への感受性を失った LepB 変異株 N274K は、K145A を変異することでコリシン D への感受性を回復したことが分かった[Chauleau M et al., 2011]。(Fig. 2-29) の図で、LepB の Box E 領域 (赤色) は、LepB の活性中心 (マゼンタで示した) と subsites S1 - S3 (青線で囲まれたところ) とは離れた位置にある。Subsites S1 - S3 は、LepB のシグナルペプチダーゼ活性により特異的に切断される N 末端シグナルペプチドが結合する領域である[Paetzel M, 2014]。

LepB の構造の中で成熟タンパク質部分と相互作用する S1'サブサイト以降は分かっていないが、BoxE 領域はクレフトを形成しており、他のタンパク質のフレキシブルなペプチドを結合できるように見える。LepB は大腸菌の内膜にあり、タンパク質の輸送で重要な役割を担う。LepB は特殊な serine protease であり、多くの分泌性タンパク質や膜タンパク質の N 末端の短い leader signal peptide を除くことができる[Paetzel M et al., 2002]。コリシン D は感受性大腸菌の内膜を通過する時に、LepB はコリシン D を捕まえる役割を担当すると思われる[Mora L et al., 2015]。LepB に捕まえられたコリシン D は、FtsH の作用でプロセッシングおよび translocation される。FtsH は ATP-dependent プロテアーゼであり、AAA+ファミリーに属する[Ito K, Akiyama Y, 2005]。細菌の FtsH は、barrel の形をしたホモ 6 量体構造であり、タンパク質の品質管理を行っている。FtsH は、主に 3 つの生理的な役割を担っていると考えられている。1 つ目には、異常タンパク質を分解する役割、2 つ目には、タンパク質の通常の代謝回転、そ

して最後に、膜タンパク質の膜への組み込みのシャペロンの役割である。Chauleau らの研究により、細胞質で検出されたコリシン D の領域は、アミノ酸配列 590-697 であることが分かっている[Chauleau M et al., 2011]。コリシン D の全体構造から見ると 590 番配列の場所は CD の内部に存在するため、 β シートの末端でもあるために、そこで切断されるためには、部分的な unfolding が必要である。シグナルペプチダーゼ LepB と LBS の相互作用は、CD を部分的に unfolding して、FtsH により切断される 589 - 590 のペプチド結合を露出させるのに必要であると考えられる (Fig. 2-30)。FtsH の作用は、コリシン D の 590 番を切断し、CRD が FtsH 六量体のトンネル構造を通過させることであると考えられる。

2-4-7 考察 7 : コリシン E3 の感受性菌への侵入経路との比較

コリシン D と同じく RNase タイプであり、結晶構造がよく知られている rRNase 活性を持つコリシン E3 がある。コリシン E3 の全体構造は Y 字型で、N 末端の translocation ドメインと C 末端の rRNase ドメインがレセプター結合ドメインで繋がった形をしている。レセプター結合ドメインは、長さ約 100 Å の coiled-coil 構造を形成し、そのほとんどが α ヘリックスである (Fig. 2-35) [Soelaiman S et al., 2001]。コリシン E3 と Imm の複合体構造は、コリシン D と異なり、Imm が rRNase ドメインの活性中心をブロックするのではなく、translocation ドメインと rRNase ドメインの間に挟まれていた。コリシン E3 は 16S rRNA に対し非常に高い特異性を示すので、Imm は rRNase ドメインがリ

ボソームと特異的に結合することを阻害していると考えられる。Mora らが 2008 年の論文に、CD には ImmD にも SIS があると示唆したことも、コリシン E3 と Imm の複合体構造を参考に推測したのではないかと考えられる。

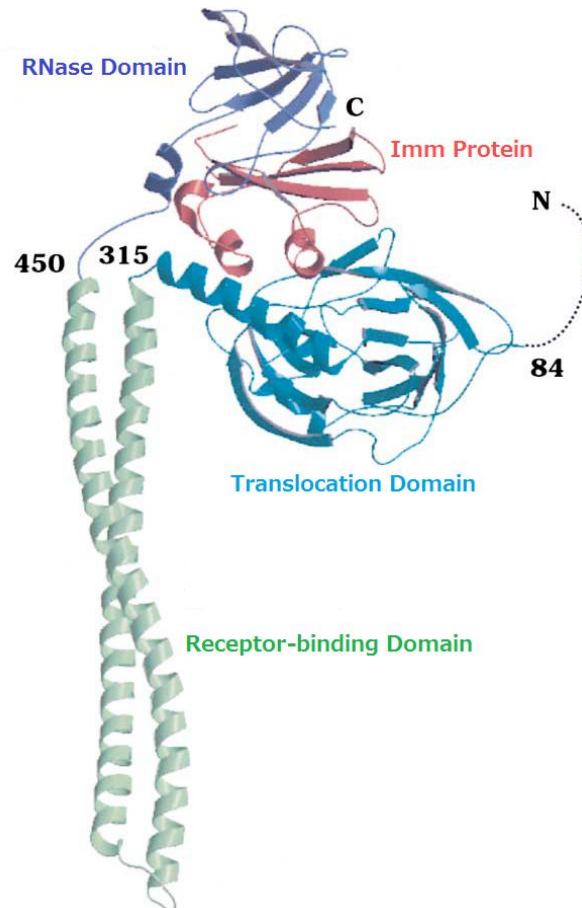


Fig. 2-35 コリシン E3 の全体構造 (PDB ID: 1JCH)

N 末端側から、青色の領域は translocation ドメイン、緑色の領域はレセプター結合ドメイン、紺色の領域は RNase ドメインである。赤色の領域は免疫タンパク質であり、translocation ドメインと RNase ドメインの間に挟まれている。

[Soelaiman S et al., 2001]から転載

コリシン E3 は感受性大腸菌の外膜に存在する BtuB レセプターと Tol システムを利用して periplasm に侵入する (Fig. 2-36) [Kurisu G et al., 2003]。コリシン E3 と BtuB の複合体結晶構造をみると、レセプター結合ドメイン (赤色の領域)

の α ヘリックスは、外膜面に対して斜めに傾いており、translocation ドメイン（青色の領域）が外膜側に位置している。レセプター結合はあたかも translocation ドメインを運ぶクレーンの働きをしているように見える。この α ヘリックスのクレーンにより、translocation ドメインが OmpF へ運ばれ、OmpF を通る際に Imm タンパク質が解離されつつ、コリシン E3 が直接外膜を透過すると考えられる。この rRNase ドメインは分子量約 15 kDa であり、6 枚の β -sheets を形成している。

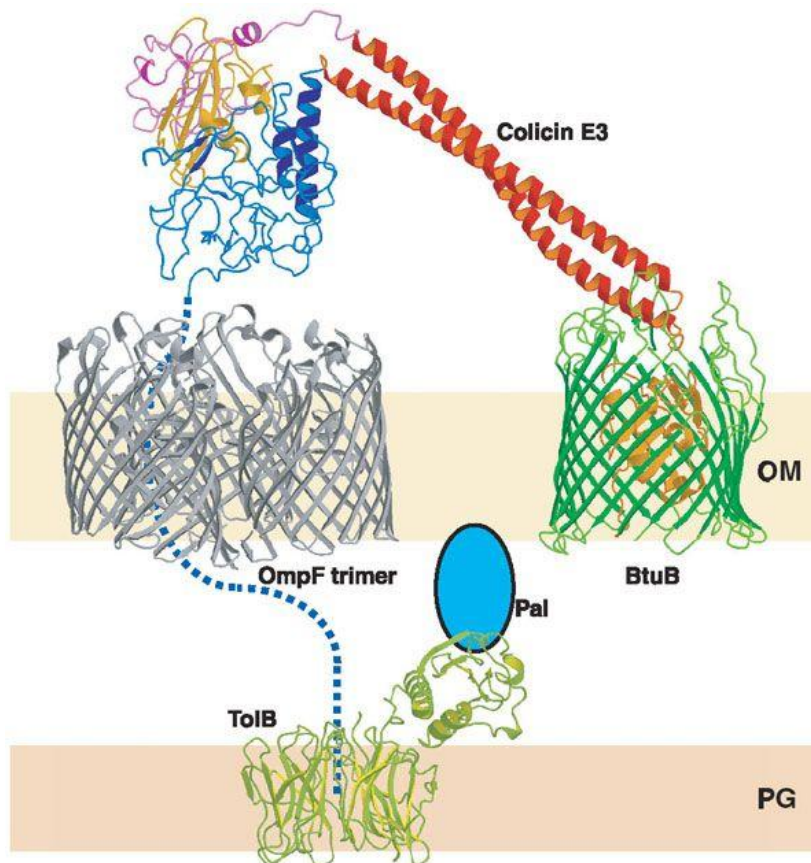


Fig. 2-36 コリシン E3 が BtuB と OmpF レセプターを利用して periplasm に侵入する模式図

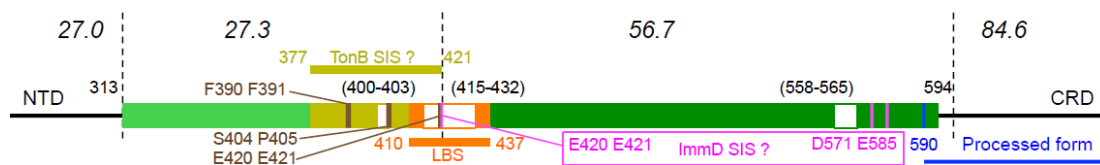
コリシン E3 は大腸菌の外膜に存在する BtuB レセプターと Tol システムを利用して periplasm に侵入すると考えられている。レセプター結合ドメイン（赤色の領域）の α ヘリックスは、外膜面に対して斜めに傾いている。

[Kurusu G et al., 2003]から転載

コリシン D と同様に、コリシン E3 は FtsH によって、C 末端の RNase 活性ドメインがプロセシングされつつ、感受性菌の cytoplasm に入ると考えられている[Chauleau M et al., 2011]。しかし、FtsH を通過するとき、コリシン D は LepB との相互作用が必要だが、コリシン E3 の場合は LepB を必要としない。Walker らの研究により、DNase タイプのコリシン（例えば E2、E7、E8 および E9）の活性ドメインは正電荷を持っており、感受性菌の内膜と相互作用することが分かっている[Walker D et al., 2007]。コリシン E3 の RNase 活性ドメインも強い正電荷（+11）を持つことで、DNase タイプのコリシンと同じく内膜と相互作用できると考えられている。一方で、コリシン D の RNase ドメインは弱い正電荷（+2）しか持っていないため、電荷的な作用だけでは、内膜と相互作用しにくいと考えられる。このため、FtsH を通過するとき、コリシン D は CD と LepB の相互作用が必要なのではないだろうか。

2-4-8 考察 8 : Klebicins とのアミノ酸配列相同性

Chavan らの報告によれば、グラム陰性菌 *Klebsiella oxytoca* は、phage 関連性バクテリオシンである klebicin D や klebicin C を生産する[Chavan M et al., 2005]。そして klebicin D と klebicin C の central ドメインは、コリシン D の CD と部分的に保存性を示していた。Fig. 2-37 で示した図には、上にコリシン D の全長 ORF を示している。一番上に書いた数字（27, 27.3, 56.7, 84.6）は klebicin D とのアミノ酸配列同一性（%）である。コリシン D の CD の C 末端側（422-607）や CRD は、klebicin D とは 56%以上のアミノ酸配列同一性を示す。



Colicin D (LBS)

410 422 437
 plllmrISLGALWFHSEEEAGAGSD-IVPGRNLEAMfslsa

Klebicin D

428 440 455
 tvatvLTLVRAALDIPAAGEGSD-RVPGRNIDMLaaqas

Klebicin C

335 347 363
 tvgpmVAAASTLFFSPRAGGSDSKVPGRDIEMLaaqar

Fig. 2-37 コリシン D と klebicin とのアミノ酸配列相同性

上にコリシン D の全長 ORF を、一番上に書いた数字 (27, 27.3, 56.7, 84.6) は klebicin D とのアミノ酸配列同一性 (%) を示した。また、下にコリシン D の LBS と、klebicin D や klebicin C の関連領域のアミノ酸配列比較の結果を示した。3 者とも AG-GSD-VPGR (赤文字) の配列 motif を持っている。

一方で、コリシン D の CD の N 末端側 (314 - 421) や NTD は、klebicin D とは約 27% のアミノ酸配列同一性しか示さない[Mora L et al., 2008]。Klebicin の免疫タンパク質も、コリシン D の免疫タンパク質 ImmD と高いアミノ酸配列相同性 (約 64%) を示す。このことから、klebicin も tRNA を切断する毒性を持っており、*Klebsiella* の外膜にある translocation システムを利用することで、感受性菌の中に入ると考えられる。Mora らの結果によれば、klebicin D の N 末端ドメイン (アミノ酸配列 1 - 317) をコリシン D の N 末端ドメインに置換すると、大腸

菌への *in vivo* 毒性を示すことが分かっている[Mora L et al., 2008]。この結果から、klebicin D の central ドメインや C 末端 RNase 活性ドメインは、大腸菌の内膜にある LepB - FtsH システムを利用できると考えられる。コリシン D の LBS と、klebicin D や klebicin C の関連領域のアミノ酸配列の比較を Fig 2-37 の下に示した。3 者とも AG-GSD-VPGR (赤文字で示した) の配列 motif を持っている[Mora L et al., 2015]。大腸菌で CD-CRD と相互作用する内膜のタンパク質のアミノ酸配列を *Klebsiella oxytoca* (AY578792) 株ゲノム中で BLAST 検索してみた結果、LepB とアミノ酸配列で約 90%同一性のある推定タンパク質の遺伝子を持っており、FtsH と約 98%同一性のあるタンパク質の遺伝子もある。更に、AG-GSD-VPGR の配列 motif は、13 種類のグラム陰性菌 (Gram-Gammaproteobacteria) のゲノム中に発見され、それらは全てヌクレアーゼ型のバクテリオシンを持っている[Mora L et al., 2015]。以上のことから、細胞の中への取り込みシステムとして、LepB はグラム陰性菌に共通のタンパク質として関与していることが示唆された。

第3章 コリシン D / tRNA 複合体の X 線結晶構造解析

3-1 目的

tRNA (transfer RNA) は、リボソームのタンパク質合成部位で mRNA 上の塩基配列を認識し、対応するアミノ酸を合成中のポリペプチド鎖に転移させるための小さな RNA 分子である。通常は D-ループ、アンチコドンループ、および T-ループと呼ばれる 3 つのループがクローバーリーフ形となっている二次構造を持ち、これが折り畳まれて三次構造は L 字型になる (Fig. 3-1)。3' (または 2') 末端には、CCA 末端と呼ばれるアミノ酸が結合する配列がある。

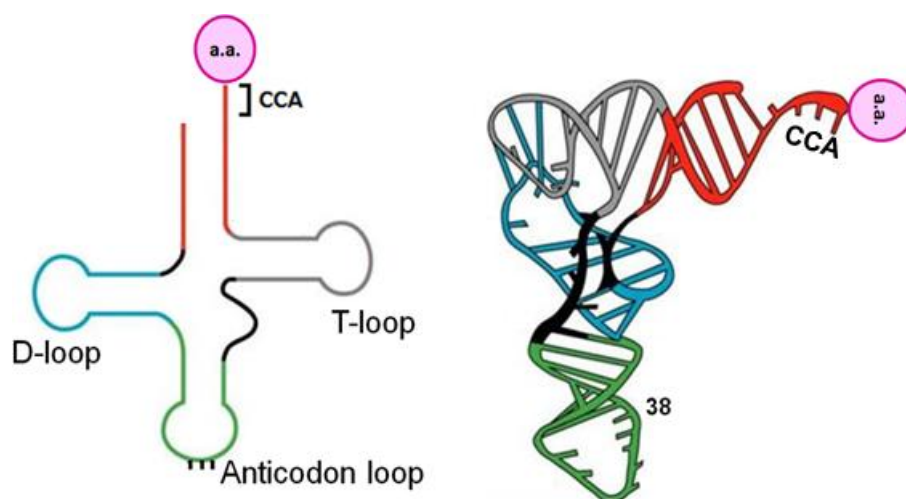


Fig. 3-1 tRNA の二次、三次構造

青は D-ループ、緑はアンチコドンループ、灰色は T-ループ、赤は acceptor stem である。3' (または 2') 末端には CCA 配列が形成されている。

コリシン D は tRNA を特異的に認識して切断する。tRNA を特異的に認識する酵素の代表例としてはアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) が知られている。ARS は class I と class II の 2 種類に分かれ、class I は tRNA の 2' 末端を、class

II は 3' 末端をアミノアシル化する (Fig. 3-2)。ARS の一部は、基質 tRNA のアンチコドンループ内の塩基に加え、3' 末端の CCA 配列の 1 つ前の塩基を主に認識することが分かっている。

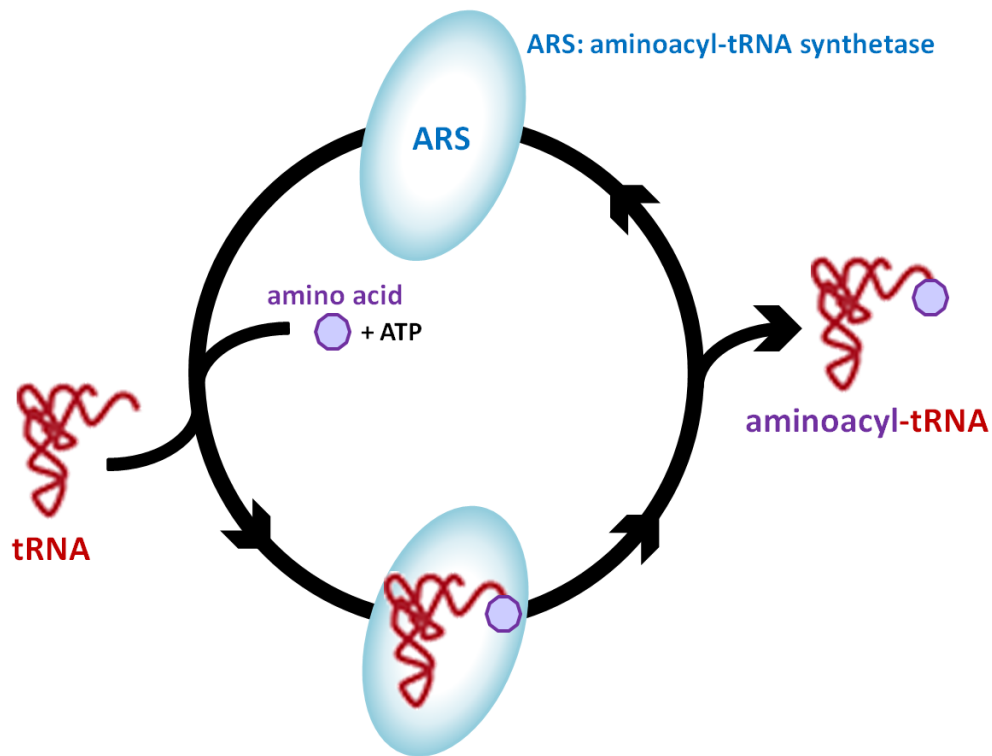


Fig. 3-2 アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) は、アミノ酸とそのアミノ酸に対応したアンチコドンを持つ tRNA の 3' 末端 OH 基にアミノ酸を結合させ、アミノアシル tRNA の合成を担う酵素である。

tRNA の認識機構を調べてみると、例えば、大腸菌 ArgRS の分子量は約 65,000 であり、tRNA の L 字型の分子全体を認識している (Fig. 3-3)。一方で、コリシン D の CRD の分子量は約 12,000 であり、ARS に比べると分子サイズは小さいが、高い基質特異性を示す。分子の大きさから考えれば、CRD は ArgRS のように tRNA 全体を認識することは不可能であり、切断部位であるアンチコド

ンループ近傍の塩基、或いはアンチコドンループの構造を認識すると予想される。

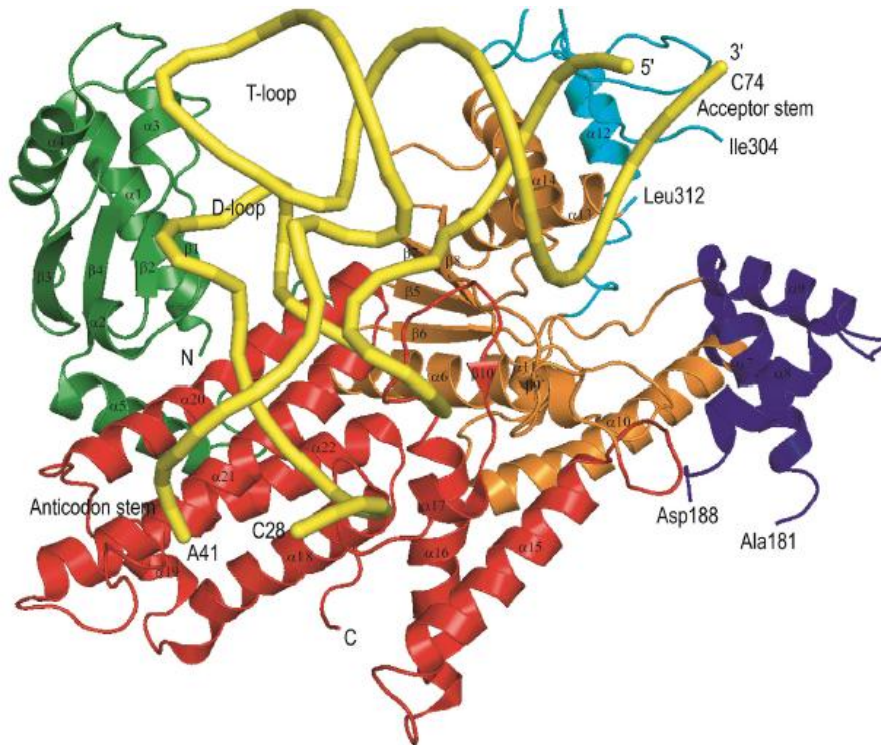


Fig. 3-3 *EcoArgRS:tRNA^{Arg}* の共結晶構造

EcoArgRS は約 70%の α ヘリックスから構成されており、22 個の α ヘリックスと 13 個の短い β ストランドを持っている。tRNA は黄色で示した。
[Stephen P et al., 2018]から転載

tRNA の D-ループと T-ループの相互作用は三次構造形成に重要である。D-ループはアミノアシル tRNA 合成酵素によって認識される部位、T-ループはリボソームによって認識される部位だと考えられている。

コリシン D の切断部位について、これまでの生化学的実験結果から、アンチコドン 3 文字目の G および D-ループ上の塩基が切断効率および基質認識に影響することが示されているが[高橋一敏、博士論文]、認識機構の完全な解明には

至っていない。そこで、本章では、コリシン D と tRNA との共結晶化を試みた。結晶性を向上させる（結晶のパッキングを形成しやすくする）ために、N 末端の長さを変化させた様々なコリシン D のコンストラクトを作成し、用いた。また、基質 tRNA について、高橋一敏の実験によれば、切断部位であるアンチコードンループだけを用いて、コリシン D と共結晶化を試みたが、結晶が得られなかった。本章では、コリシン D による切断を受けづらくするために塩基置換を施すなどの工夫を試みた。

3-2 材料と方法

3-2-1 使用菌株とプラスミド

ここで使用した菌株およびプラスミドは、主に 2-2-1 で使用したものと一緒である。

3-2-2 コリシン D の精製及び濃縮

コリシン D の大量発現、精製および濃縮は、主に 2-2-2 および 2-2-3 と同様に行った。

3-2-3 T7 RNA Polymerase の調製

IPTG 誘導によって T7 RNA polymerase を大量発現する大腸菌の発現系は、鈴木勉博士（東京大学）よりご恵与頂いた。文献[Milligan JF, Uhlenbeck OC, 1989]を参考して、His-tag が付与された T7 RNA polymerase を HiTrap Chelating HP（GE Healthcare）カラムを用いて精製した。得られたタンパク質溶液を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 30 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT に対して透析した。

3-2-4 基質 tRNA 遺伝子を有するプラスミドの調製

プラスミドの調製は、高橋一敏の修士論文を参考にした。鑄型となる DNA はプラスミド pUC18-T7-tRNA^{Arg} を制限酵素 *Mva*I で処理したものをを用いた。このプラスミド (pUC18-T7-tRNA_{ACG}) は tRNA^{Arg}_{ICG} 配列の 3'末端を *Mva*I (Takara)

で切断することで、T7 RNA polymerase による run off 転写が可能となり、3'末端に正しく CCA を有する tRNA^{Arg}_{ACG} が調製出来る。pUC18-T7-tRNA_{ACG} を大腸菌 DH5α 株に導入し、この株を、アンピシリンを終濃度で 100 µg/mL になるように添加した L-broth (1% Bacto tryptone (Difco), 0.5% Yeast extract (Difco), 0.5% NaCl (国産化学)) 10 mL に植菌し、37 °C、8 時間前培養した。次に、5 L のコブ付き三角コルベンを用いて、1 L の L-broth に前培養液 10 mL を植菌し、37 °C で 12 時間の振盪培養をすることで本培養とした。その後、遠心 (4 °C、8000 rpm、5 分間) により回収した菌体から、QIAGEN plasmid MEGA kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出し、MvaI による処理を行った。

3-2-5 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物の調製

3-2-4 で得られたプラスミドを鋳型として、3-2-3 で得られた T7 RNA polymerase を用いて *in vitro* 転写を行った。反応は 10 mL スケールで行い、反応液組成は 80 mM HEPES-NaOH (pH 8.3), 40 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM spermidine, 14 µg / mL BSA, 5 mM each NTP, 1 unit / mL pyrophosphatase (Sigma) , 80 µg / mL T7 RNA polymerase とした。鋳型 DNA を加えて 37°C、1 時間転写させた。3 時間後に、さらに T7 RNA Polymerase を追加することで収量の増加を図った。その後、サンプルを Milli-Q に溶解し、4xLoading solution (組成は 9 M 尿素, 0.04% ブロモフェノールブルー, 0.04% キシレンシアノールである。以降は 4xLS と表記する) 3.3 mL を加えて反応を止めた。

3-2-6 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物のゲル精製

転写した tRNA 転写産物を、電気泳動にて分離精製した。tRNA の泳動には 10%変性ゲル (7 M Urea, 10%アクリルアミド, 1 X TBE buffer) (20 x 40 x 0.03 cm) を用い、20 mA の定電流で一晩泳動した。BPB がゲルの一番下まで流れたところで電気泳動を停止した。泳動後、UV シャドウイング法 (蛍光板をゲルの下に敷き UV 照射することで、転写産物は紫外線を吸収し黒いバンドとなる。) にて目的のバンドを切り出した。ゲルを細かく切断した後、50 mL の遠心チューブに移し、Milli-Q を加えて 37°C で、24 時間振盪することにより tRNA をゲルから溶出した。この溶出溶液を 0.2 μm のフィルターでろ過し、エッペンドルフチューブに分注し、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム(pH 5.3)、2.5 倍量の 99.5% エタノールを加えて、-20 °C で 15 分冷却し、エタノール沈殿を行った。沈殿を遠心で回収し、Milli-Q 水に溶解して基質として用いた。サンプルの濃度は分光光度計による A260 吸収で測定した。

3-2-7 化学合成 tRNA

38 位の A のみをデオキシ化した tRNA^{Arg}_{ACG} の合成は、株式会社ジーンデザインに依頼した。配列は以下に示した。

GCAUCCGUAGCUCAGCUGGAUAGAGUACUCGGCUACGAdACCGAGCGG
UCGGAGGUUCGAAUCCUCCCGGAUGCACCA

3-2-8 基質 tRNA 転写産物の refolding

基質 tRNA 転写産物の溶液を 1 mM MgCl₂、85 °C で、20 分間加熱した後に放冷させることにより tRNA 転写産物の refolding を行った。

3-2-9 各長さが違うコリシン D と各基質 tRNA との結晶化

コリシン D と基質 tRNA 複合体の結晶化のために、各長さが違うコリシン D と各基質 tRNA、それぞれモル比 1 : 1.2 で混合し結合させた。両者を合わせた終濃度が 10 mg/mL となるように混ぜ合わせ、20°C で 15 分間インキュベートし、これを結晶化のスクリーニングに用いた。結晶化は 1-2-4 と同様に行った。

3-2-5 X 線回折データ収集及び解析

X 線回折データの収集は 1-2-5 と同様に行った。実際のデータ収集及び構造解析は東京大学定量生命科学研究所の佐藤裕介助教に行っていただいた。

3-3 結果および考察

3章で試したコリシン D および基質 tRNA の組み合わせを (Table 3-2) にまとめた。

3-3-1 コリシン D の最小活性ドメイン CoID591 と基質 tRNA^{Arg}_{ACGdA} の共結晶化

コリシン D と基質 tRNA 複合体の結晶化においては、コリシン D-CRD と基質 tRNA の両者が安定的に複合体を形成することが重要であり、基質 tRNA の切断を防ぐ必要がある。一方で、コリシン D は基質 tRNA を分解し、コリシン D は高濃度においては基質 tRNA を非特異的に分解するので、野生型コリシン D-CRD と修飾されていない基質 tRNA^{Arg}_{ACG}との組み合わせで複合体を得ることが困難だと考えた。

コリシン D の 611 番目の His を Tyr へと変異させることにより、tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物に対する切断活性が野生型に比べ、約 0.1%以下に低下することが分かっている [Tomita K et al., 2000]。そこで、コリシン D の活性中心変異体 (CoID595-H611Y) と tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物との共結晶化を試してみたが、共結晶は得られなかった。この理由として、CoID595-H611Y 変異体の切断活性が低下したが、野生型の 0.1%以下の残存活性でも十分に基質 tRNA を切断してしまい、安定な複合体が得られないと推定された [高橋一敏、博士論文]。

また、全長の tRNA^{Arg}_{ACG} において、切断部位のみを化学修飾したもの (3-2-7 を参考する) を用いた共結晶化が寺本により行われた [寺本和矢、卒業論文]。し

しかし、化学修飾した基質 tRNA は全て化学合成するため高価であり、大規模なスクリーニングには不向きであった。そこで、代案として T7 RNA polymerase により、dATP, GTP, CTP, UTP を基質とし、全てのアデニンをデオキシ化した転写産物の tRNA^{Arg}_{ACG}dA 調製法が提案された。こうして得られたデオキシ化基質アナログ tRNA 転写産物 (Fig. 3-4) は、urea-PAGE を用いて確認したところ、野生型コリシン D により全く切断されないことが分かった (Fig. 3-5)。これは tRNA^{Arg}_{ACG} の切断部位 5' 側の A38 が 2' -deoxy となるためと考えられる。

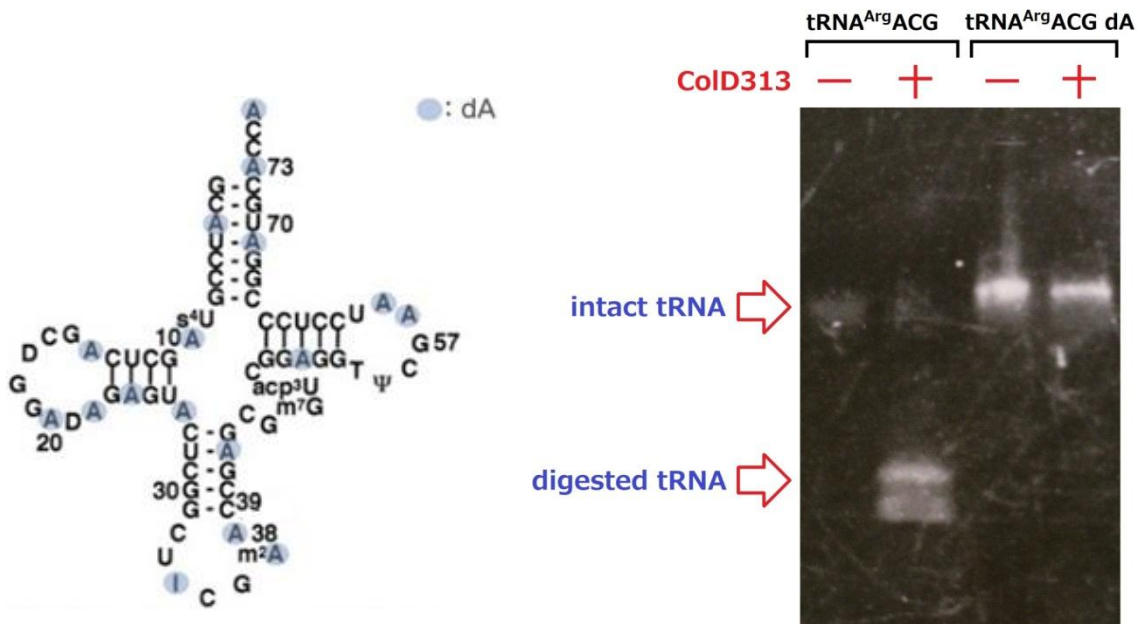


Fig. 3-4 tRNA^{Arg}_{ACG}dA の模式図
T7 RNA polymerase により、dATP, GTP, CTP, UTP を基質とし、全てのアデニンがデオキシ化された転写産物である tRNA^{Arg}_{ACG}dA。
青い丸で表記したところはデオキシ化されたアデニンである。
I は inosine である。

Fig. 3-5 Urea-PAGE を用いた基質 tRNA^{Arg}_{ACG} および基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACG}dA に対するコリシン D の切断活性の検出

ImmD を除いた野生型コリシン D の活性ドメイン ColD591 とこの基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物の共結晶化を 20°C および 4°C で試みた。しかし、スクリーニングを複数回繰り返したが、結晶は得られなかった。また、基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物の 3' 末端側には二本鎖を組んでいない⁷³ACCA⁷⁶ 配列が含まれる (Fig. 3-4)。この配列の構造不安定性によって、共結晶が出にくくなる影響を与えることが考えられたため、⁷⁴CCA⁷⁶ 配列や⁷³ACCA⁷⁶ 配列を削った変異型 tRNA^{Arg}_{ACGdA} を作製した。これらと ColD591 との共結晶化を 20°C および 4°C の条件で試してみたが、結晶は得られなかった。

他方、コリシン D591 の分子量は約 12.3 kDa であり、基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物の分子量は約 25 kDa である。このことを考えるとコリシン D591 タンパク質の分子量が小さすぎて、結晶内の複合体分子のパッキングがしにくいため、結晶が得られない可能性があった。この改善方法としてコリシン D591 タンパク質の N 末端側を伸ばすことを考えた。どこまで伸ばすかの指標とするため、配列の保存性を検索した。基本的に、構造が既知で良く保存されたコリシン D の領域は安定な構造を持つと考えられる。配列を検索してみた結果、ColD311 以降の配列は translation initiation factor 2 (*Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880) に似ており、ColD422 以降の配列は klebicin D activity protein (*Klebsiella oxytoca*) に似ており、ColD313 以前の配列はコリシン B (*Escherichia coli*) の N 末端側に似ていることが分かった (Fig. 3-6, Fig. 3-7, Fig. 3-8)。 *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880 の、DNA の配列解析は University of Wisconsin の Genome Evolution Laboratory で行われてい

る。しかし、ここで translation initiation factor 2 と呼ばれている配列の機能については不明である。恐らくアノテーションのミスと考えられる。Klebsiella D は、*Klebsiella oxytoca* から生産したコリシン様の bacteriocin であり、コリシン様の tRNA を切断する活性を持つと推定される。Klebsiella D の全長配列において 1 - 314 は colicin-like bacteriocin RNase domain (pfam03515) に属し、467 - 609 は S-type Pyocin (pfam06958) に属し、626 - 710 は Colicin D (pfam11429) に属する。ColD309、ColD418、および ColD313 を作製し、精製したタンパク質と基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACG}dA 転写産物との共結晶化を試みた。

```

ColD  MSDYEGSGPTEGIDYGHSMVWVWVSTGLISGGDVKPGGSSGIAFSPMPFPGWDYSPQGIALV 60
TIF2  -----MNAIKSDSYVNN-----VLKELQKKVRAVAAPHAKVYL 32

ColD  QSVLFFPGIIRRIILDKELEEGDWSGWSVSVHSFWGNEKVSAAARTVLENGLRGGLPEPSRP 120
TIF2  SGVDDTGRVQLQVG-----EINRAEEAAVSQALASVPQVKNVLGMGFNDKAV 80

ColD  AAVSFARLEPASGNEQKIIRLMVTQQLLEQVTDIPASQLPAAGNNVPVKYRLMDLMONGTQ 180
TIF2  VFGANIDTPHRIIGN-----YQGVFNGNNGNSNSAAEDKASLATYSEVVLNGKIP 128

ColD  YMAITGGIPMTVPVVDVAVFVDRSRPPTNIKDVYSAPVSPNIPDLIVLSVGQMNTEVLSNP 240
TIF2  PGFWDLNDRVMTEVTIKYEINGGGKGGDRTGYRKSNAEVPSITAAAYKQFKQVEREVAEEA 188

ColD  EIQEEGVIAETGNYVEAGYTMSSNNHDVIVRFPEGSDVSPLYISTVEILDSNGLISORQEA 300
TIF2  RRAEEARAEETRRAEEAR-----KVEEARRVEEARKA 221

ColD  ENKAKDDFRVKKEEAVARAEAEKAKAELEFSKAGVNOFPVYTCMEMMERANSVMNEQCALVL 360
TIF2  EEARKAEARKAEARK---VEARKALEFKAGIMDAPAYTEKPKAANAALAAAGAMVL 278

ColD  NNTASSVQLAMTGTGVWTRAGDIAGNISKFSSNALEKVTIPEVSELLMRLISLG---ALWF 417
TIF2  NRAFAMLCQSMVGGVMTTSELAGWAASASWRAAYEVGSIKAGTAVAAGSVLGAFAALGF 338

ColD  HSEEAGAGSDIVPGRNLEAMFSLSAOMLAGQGVVIEPGATSVNLPVVRGOLINSN-GQLAL 476
TIF2  YPTEVGAGSDRVPGRDVN-LEFLQASLAAAGRTTIQPGMTSVDLPVRGFITTTDDLGRQSV 397

ColD  DLLKTGNESIPAAVPVLNAVVDATATGLDKITLPAVVGAPSRITILVNPVPO-PSVPTDTGN 535
TIF2  NEVRTGVGGVSPSPVPVFRVREDELTLGLDKITLPAVAGAPARTILINPVPTGPAABAHTGN 457

ColD  HQPVEVTPVHTGTEVKSVEVPVTTITPVSEVGGELRDFIYWRPDAAGTGVEAVYVMINDPL 595
TIF2  GSPGPKSPVHTGTGIRQADSIVVTTFPADVQQLQDFILWCPDALETGVEAVYVMVSDPL 517

ColD  DSGRFSRKQLDKKYKHAGDFGISDTKKNRETLTKFERDAIEHLSDKDTVEKGTYRREKGS 655
TIF2  DSGRFRKQLDKKYKHASDFGIADTRKNRETLTQYRDAIEHLSDKDTVEKGTYRREKGS 577

ColD  KVYFNPNTMNVVVIKSNGEFLSGWKINPDADNGRIYLETGEL 697
TIF2  KVYFNPNTMNVVVLKENGDFLSGWKINPDADNGRIYLDTGDL 619

```

Fig. 3-6 コリシン D と translation initiation factor 2 (*Serratia marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880) の配列を比較した結果
赤点で表記した場所は ColD311 番目の残基であり、以降の配列は 81.9%の相同性を示した。

```

ColD MSDYEGSGPTEGIDYG-HSMVVVWVSTGLISGGDVKPG--GSSGIAPSMPPGWDYSPQGI 57
KleD MSDITYNPNEDYNNGIPPEPGLVWKPGGSFPNGSYVPGSWGWPTRGYDVPPLPGDTEMLTV 60

ColD ALVQSVLFPGIIR-----RIILDKLEEGDWSGWSVSVHSPWGNEKVSAAARTVLENGLR 111
KleD TPKGTPADTWPKRPFDIKEWYVFGKPFDPSTGNGWVVDVGYAESLPAGIPAVVQAAISK 120

ColD G-GLPEPSRPAAVS FARLEPASGNEQKIIR---LMVTQCLEQVTDIPASQLPAAGNNVPV 167
KleD VKGAPLKGMSAVDIWKLKPAEYFGRFNSTDEAFS WFFVRALTDTDI SAMPVAFETVPV 180

ColD KYRLMDLMQNGTQYMAIIGG--IPMTVPVVDVAVPVPDRSRPPTNIKDVYSAPVSPNLPDL 225
KleD HRLIDDNVHDGVOEVS AVFAGSMQYNLPVVKQAQATAG-----SDYYTIGRLPGIISA 232

ColD VLSVGMNTFVLSNPEIQEEGVIAETGNYVEAGYTMSSNNHDVIVRFPEGSDVSPLYIST 285
KleD FTFS--FYTKGTFQDSRFFRDIVKAGGLREAGFTVGANTSDFIILWFPOGSGLEPLYFSM 290

ColD VEILDSNGLSQRQEAENKAKDDFRVK-----KBEAVARAEEAEKAKAELFSKAGVNOP 337
KleD TMNMPAGELQRRQEAENKARAFADRLRAEAEAKIRAEAEARAKAEAERKALFAKAGIQDT 350

ColD PVYTCEMMERANSVMNEOGALVLNNTASSVQLAMTCTGVWTAAGDIAGNISKFFSN---- 393
KleD PVYTCEMVKAANAALASAGGSMALSRAPGMTQHSAAAGVGTLPFNSSLAGWEAGALWRGVDV 410

ColD -ALEKVTIPEVSPLLMRIISLGALWFHSEEAGAGSDIVPGRNLEAMFSLSAQMLAGQGVVI 452
KleD IARIAPVSAVATVATVLTLLVRAALDIPAGEGSDRVPGRNID-MLAAQASLYTAMKTNI 469

ColD EPGATSVNLPVRGQILINS-NGQALDLDLKTGNESTBARVPVLNAVRDTATGLDKITLPAV 511
KleD QPGMRTVLDLPVRGYISYDCNGRQSVNLRVTGTGGVSAIVPVLSAVRDKTTGLDKITVPAV 529

ColD VGAPSRTILVNPVPEQ-PSVPTDTGNHQVVPVTPVHTGTEVKSVEMPVTTITPVSDVGGLR 570
KleD AGAPSRTILINPVPEVPATPSHTGSSTPVPVTPVHTGTDVKQADSIVTTTLPADIPALQ 589

ColD DFIYWQPDAAAGTGVEAVYVMLNDPLDSGRFSRKQLDKKYKHAGDFGISDTRKNRETITKE 630
KleD DFIYWQPDATGTGVEFIYVMLS DPLDSGKYTRRQLQKKYKHAI DFGITDTRKINGETITKE 649

ColD RDAIEEHLSDKDTVEKGTYYRREKGSKVYFNPTMNVVIIKSNGEFLSGWKINPADNGRI 690
KleD RDAIEEHLSDKDTFEKGTYYRRDKGSKVYFNPTMNAVIIQANGDFLSGWKINPADNGRI 709

ColD YLETGEL 697
KleD YLETGDL 716

```

Fig. 3-7 コリシン D と klebicin D (*Klebsiella oxytoca*) の配列を比較した結果
赤点で表記した場所は ColD422 番目の残基であり、以降の配列は 89.6% の相同性を示した。

```

ColD MSDYEGSGPTEGIDYGHSMVVWPSTGLISGGDVKPGGSSGIAPSMPPGWDYSPQGIALV 60
ColB MSDNEGSVPTEGIDYGDTMVVWPSTGRIFGGDVKPGGSSGIAPSMPPGWDYSPQGIALV 60

ColD QSVLFPGIIRRIILDKELEEGDWSGWSVSVHSPWGNEKVAARTVLENGLRGGLPEPSRP 120
ColB QSVLFPGIIRRIILDKELEEGDWSGWSVSVHSPWGNEKVAARTVLENGLRGGLPEPSRP 120

ColD AAVSFARLEPASGNEQKIIRLMVTQOLEQVTDIPASQLPAAGNNVPVKYRLMDLMQNGTQ 180
ColB AAVSFARLEPASGNEQKIIRLMVTQOLEQVTDIPASQLPAAGNNVPVKYRLMDLMQNGTQ 180

ColD YMAIIGGIPMTVPVVDVAVPVPDRSRPGTNIKDVYSAPVSPNLPDLVLSVGQMNTPVLSNP 240
ColB YMAIIGGIPMTVPVVDVAVPVPDRSRPGTNIKDVYSAPVSPNLPDLVLSVGQMNTPVLSNP 240

ColD EIQEEGVIRSETGNYVEAGYTMSSNNHDVIVRFPEGSQVSPLYISTVEILDSNGLSQRQEA 300
ColB EIQEDGVIRSETGNYVEAGYTMSSNNHDVIVRFPEGSQVSPLYISAVEILDSNLSQRQEA 300

ColD ENKAKDDFRVKKEEAVARAEEAKAKAELEFSKAGVNQPFVYTQEMMERANSVMNEQCALVL 360
ColB ENNAKDDFRVKKEQENDEKTVLTKTSEVIIISVGDKVG----- 337

ColD NNTASSVQLAMTGTGVWTAAGDIAGNISKEFSNALEKVTIPEVSPLLMRISLGALWFHSE 420
ColB -----EYLGDKYKALSREIAENINNEQG----- 360

ColD EAGAGSDIVPGRNLEAMFSLSAQMLAGQGVVIEPGATSVNLPVVRGQLINSNGQLALDILK 480
ColB -----KTIRSYDDAMSSINKLMANPSLK 383

ColD TGNESIFAAVEVLNAVRDTATGLDKITLPAVVGAPSRITLVNPEVPOPSVPTDTGNHQFVP 540
ColB INATDKKALVNAWKAFNAEDMGNKFAALGKTFKAADYAIKANNIREKSIIEGYQTGNWGPL 443

ColD VTFVHTGTVEKSVEMPVTTITFVSDVGGRLRDFIYWRPDAAGTGVEAVYVMLNDPLDSGRF 600
ColB MLEVESWVWISGMASAVALSLSLTLGSALIAFLSATVVGFGVVIAGAIQAFIDDKFVD 503

ColD SRKQLDRKRYKHAGDFGISDTKKNRETLTFRDAIEEHLSDKDTVEKGTYRREKGSKVYFN 660
ColB ELNHKIIK----- 511

ColD PNTMNVVVIKSNGEFLSGWKINPDADNGRIYLETGEL 697
ColB ----- 511

```

Fig. 3-8 コリシン D とコリシン B の配列を比較した結果

赤点で表記した場所は ColD313 番目の残基であり、それより前の配列は 95.2%の同一性を示した。

3-3-2 ColD309, ColD418 および ColD313 と基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物の共結晶化

3-3-1 に述べたように、コリシン D の活性ドメイン ColD591 より N 末端側の配列を伸ばした ColD309、ColD418、および ColD313 タンパク質を精製し、基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物と混合して、共結晶化を試みた。しかし、ColD309 - tRNA^{Arg}_{ACGdA} 複合体の結晶は観察できなかった。また、タンパク質

ColD418 を精製したところ、Mono Q カラムをかけて回収したサンプルを SDS-PAGE で確認した結果、ColD418 の N 末端側に複数の分解されたバンドを確認した (Fig. 3-9)。このことから ColD418 の N 末端には分解を受けやすい領域が存在し、共結晶化に向いていないと判断した。

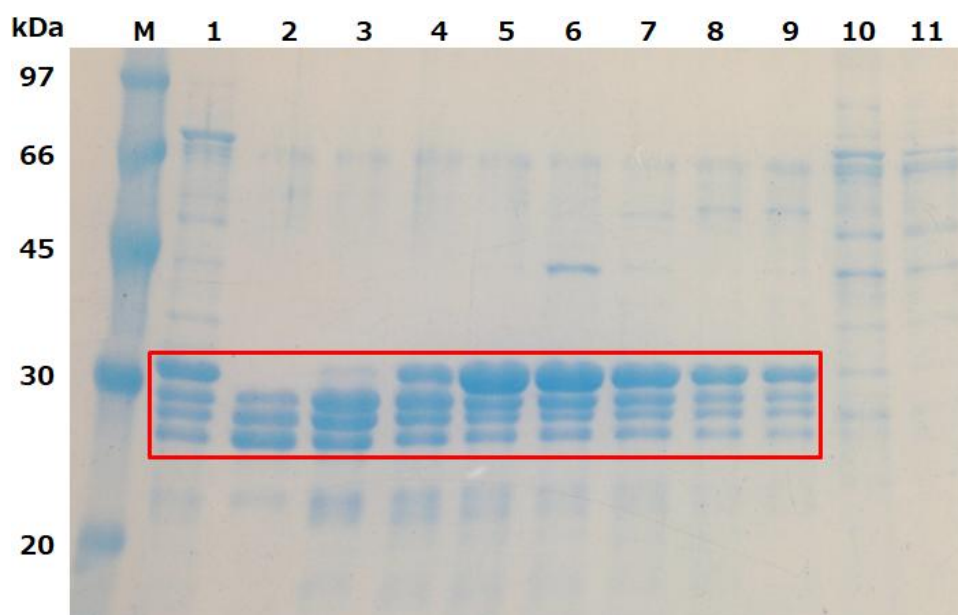


Fig. 3-9 Mono Q カラムをかけて精製し、回収したコリシン D418 を SDS-PAGE で確認した結果
ColD418 の分子量は約 30.1 kDa であり、目標タンパク質のバンドの付近に複数の分解されたバンドを確認した (赤線で囲まれた部分)。
M はマーカ。

一方で、ColD313 と基質アナログ $tRNA^{Arg}_{ACGdA}$ 転写産物の共結晶化スクリーニングを試し、20°C および 4°C の静置条件下で結晶を観察できた。結晶を拾い、結晶化用の溶液を用いて結晶を洗い、水で溶かした後に、電気泳動を確認してみたところ、ColD313 タンパク質 (SDS-PAGE を用いた) および基質アナログ $tRNA^{Arg}_{ACGdA}$ 転写産物 (urea-PAGE を用いた) のバンドが確認された (Fig. 3-10)。

このことから拾った結晶の中に ColD313 タンパク質および基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物の両方とも含まれることが考えられた。

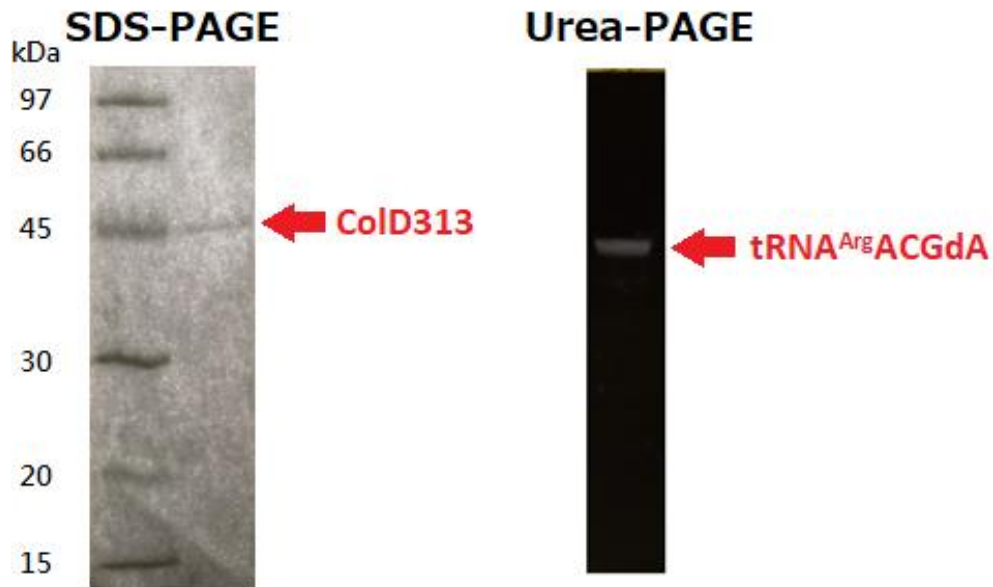


Fig. 3-10 コリシン D313 と基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 共結晶の電気泳動による分析
左側の SDS-PAGE の結果により、分子量約 41.3 kDa のところにコリシン D313 タンパク質のバンドを確認した。右側の Urea-PAGE の結果により、基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} のバンドを確認した。以上の結果から、拾った結晶の中に ColD313 タンパク質および基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 両方とも含まれることを考えた。タンパク質の検出には Simply Blue™ Safe Stain を、tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物の検出には SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain を用いた。

しかし、2 章で説明された ColD313 の単体構造と比較したところ、ここで拾った結晶はすべての ColD313 の活性中心に基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物に対応する電子密度が確認できず、ColD313 の単体結晶であることが判明した。ColD313 の単体結晶にも関わらず、電気泳動で ColD313 タンパク質および基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物の両方が検出できた理由の 1 つに、tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物の検出感度が挙げられる。本研究で用いた SYBR™ Gold

Nucleic Acid Gel Stain は 25 p グラムの核酸まで検出できるほど、検出感度が非常に高い（製品説明書）。例えば結晶化用の溶液を用いて拾った結晶を洗ったとしても極微量な基質アナログ $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACGdA}}$ 転写産物が結晶とともに残されると、電気泳動で検出されることになる。実際にその後複数回も ColD313 と基質アナログ $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACGdA}}$ と $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACG}}$ 転写産物の共結晶化スクリーニングを試したが、現れた結晶は全てコリシン D313 タンパク質の単体結晶であった。

3-3-3 コリシン D313 および D324 の活性中心変異体 H611Y と、基質アナログ $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACGdA}}$ 転写産物および $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACG}}$ 転写産物との共結晶化

本研究以前より、コリシン D の活性中心変異体（ColD595-H611Y）と $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACG}}$ 転写産物との共結晶化は試みられてきたが、共結晶は得られなかった[高橋一敏、博士論文]。2章の実験結果により、コリシン D313 は、コリシン D590 より結晶化しやすく、結晶化スクリーニングによってもコリシン D590 より多くの結晶条件が見出された。そこで、コリシン D313 の活性中心変異体（ColD313-H611Y）を用いて $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACG}}$ 転写産物との共結晶を試してみると、複合体の結晶が得られるのではないかと考えた。或いは、 $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACG}}$ 転写産物が切断されたとしても ColD313-H611Y から離れるよりも、先に複合体の結晶が形成するかもしれないと期待した。また、コリシン D に切断されない基質アナログ $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACGdA}}$ 転写産物も使い、ColD313-H611Y との共結晶化スクリーニングを試した。20°C および 4°C の静置条件下で、結晶化スクリーニングを実験した結果、ColD313-H611Y と基質 $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACG}}$ 転写産物からも、ColD313-H611Y

と基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物からも共結晶が観察されなかった。コリシン D の E313 - S330 は長いヘリックス状の構造であり、この linker ヘリックスの領域を短くすれば共結晶化しやすくなるのではないかと期待した。そこで、コリシン D313 をさらに結晶化しやすくなるように検討してみた。また、2 章の結果により、コリシン D のヘリックス上の K325 と T582 は分子内で相互作用があるため、それを残してその直前、K323 までのヘリックスを切除した ColD324-H611Y 活性中心変異体を作製した (Fig. 3-11)。

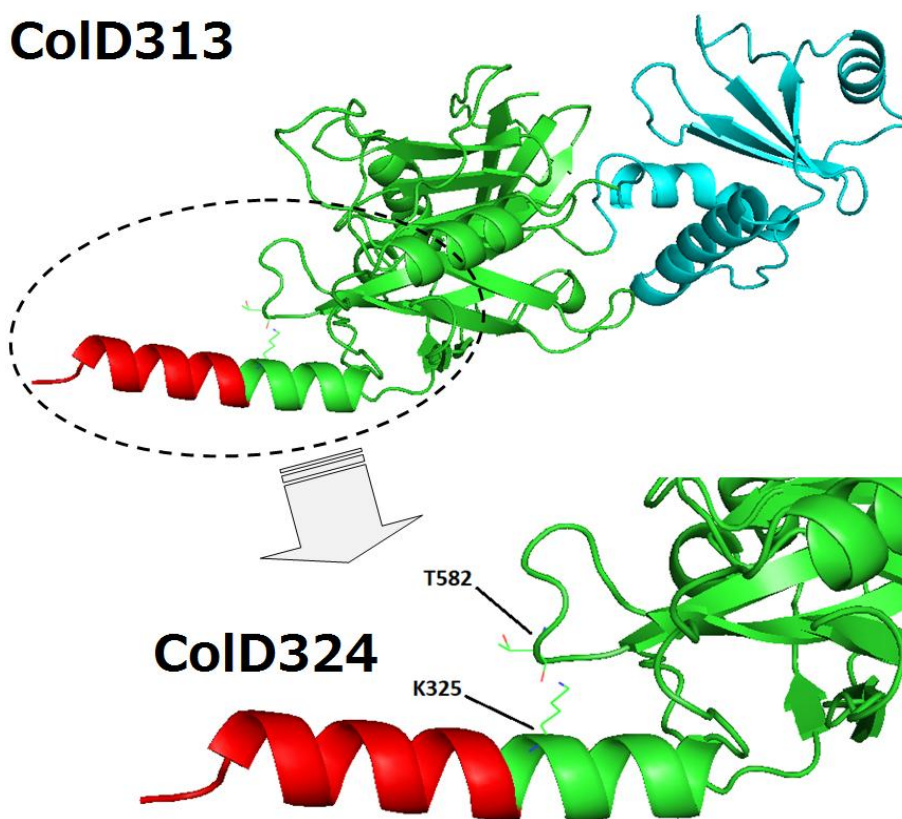


Fig. 3-11 コリシン D の linker ヘリックス近傍の模式図
緑色は CD (324 - 594) であり、青色は CRD (595 - 697) である。E313 - K323 領域を赤色に示し、この linker ヘリックスの領域を削って ColD324-H611Y 活性中心変異体を作製した。このとき、K325 と T582 は構造的に相互作用があることを考慮した。

これを用いて 20°C および 4°C の静置条件下で、CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物、および CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}_{ACG}dA 転写産物の共結晶化スクリーニングを試みた。まずは、CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物の組み合わせは、結晶が観察されなかった。CoID324-H611Y の切断活性が低下し、また 4°C の静置条件下では基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物を切断する反応も遅くなると予想したが、urea-PAGE を用いて共結晶化に用いたサンプルの様子を調べたところ、それでも残存活性で十分に基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物が切断されていることが分かった (Fig. 3-12)。すなわち、4°C で 3 日間に置いたら tRNA^{Arg}_{ACG} が部分分解されたバンドが見え、1 ヶ月間に置いたら tRNA^{Arg}_{ACG} が完全に分解されたことが分かった。

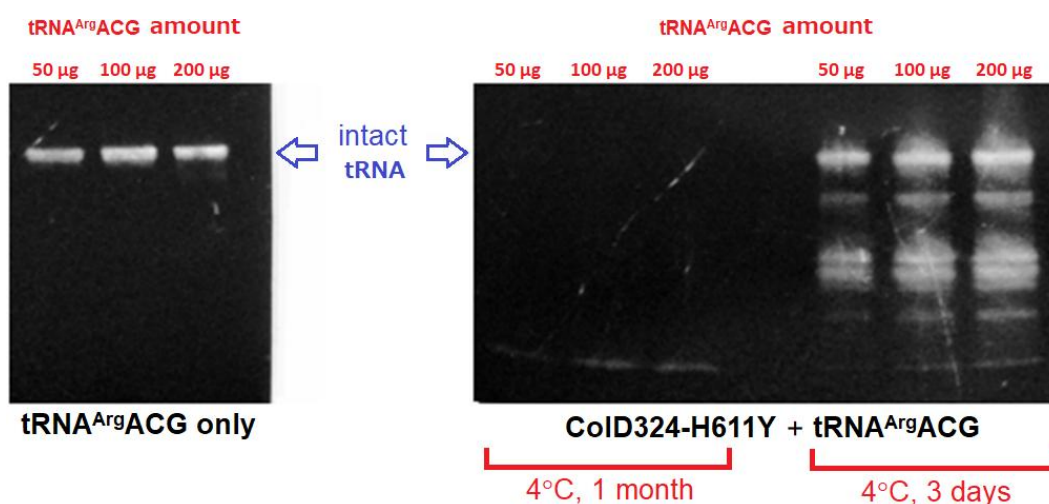


Fig. 3-12 tRNA^{Arg}_{ACG} の CoID324-H611Y 依存的分解

4°C で 3 日間静置すると tRNA^{Arg}_{ACG} が分解されたバンドが見え、1 ヶ月間に静置すると tRNA^{Arg}_{ACG} が完全に分解されたことが分かった。tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物の検出が SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain を用いて行われた。

共結晶化の条件下では、CoID324-H611Y の濃度が通常の酵素反応条件より非常に高く、基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物と 1 : 1.2 の比率で混ぜてから 3 日後には、

tRNA^{Arg}_{ACG} が 2 本のバンドではなく、複数のバンドに切断された。ここでは、複数回の実験を行い、tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物が複数のバンドに切断された現象は、ヌクレアーゼの混入或いは実験のミスによる結果ではないことを確認した。よって、基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物が非特異的に切断され、最終的に tRNA^{Arg}_{ACG} が細かく分解されたと判断された。

一方で、CoID324-H611Y と基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物の組み合わせも urea-PAGE を用いて調べた。こちらは 4°C で 1 ヶ月間置いても tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物は分解されていないことが分かった (Fig. 3-13)。

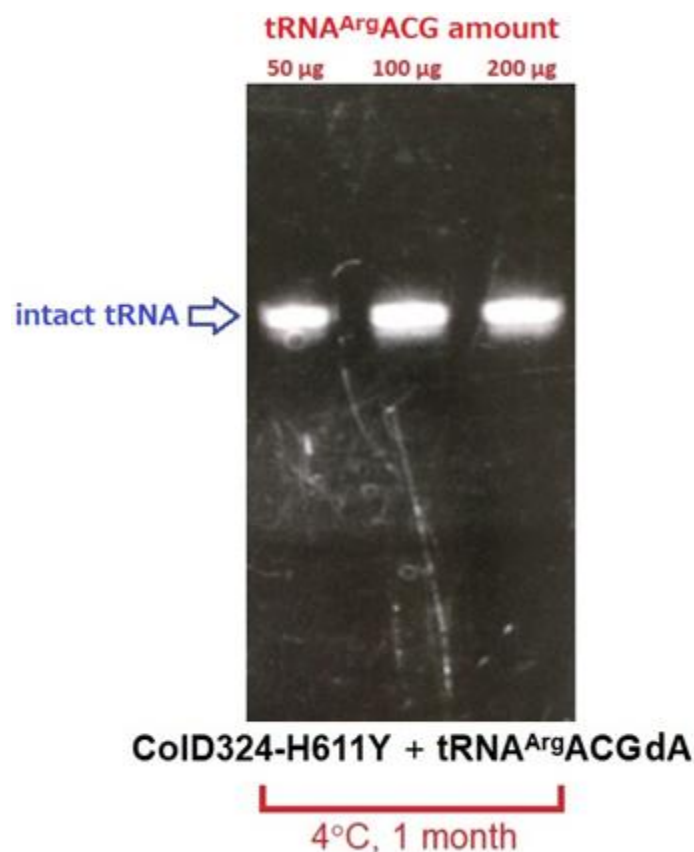


Fig. 3-13 tRNA^{Arg}_{ACGdA} の CoID324-H611Y による分解調査
4°C で 1 ヶ月間静置しても tRNA^{Arg}_{ACGdA} が分解されないことが urea-PAGE より分かった。

また、HPLC のゲルろ過カラム（Shodex PROTEIN KW-803）を用い、4°C で 3 日間放置した CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}_{ACGdA} 混合液を調べた（Fig. 3-14）。ゲルろ過の結果により、CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}_{ACGdA} を混ぜて 3 日間静置したものはシングルピークが観察できたため、両者は結合状態を保ち、tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物も分解されていないことが分かった。

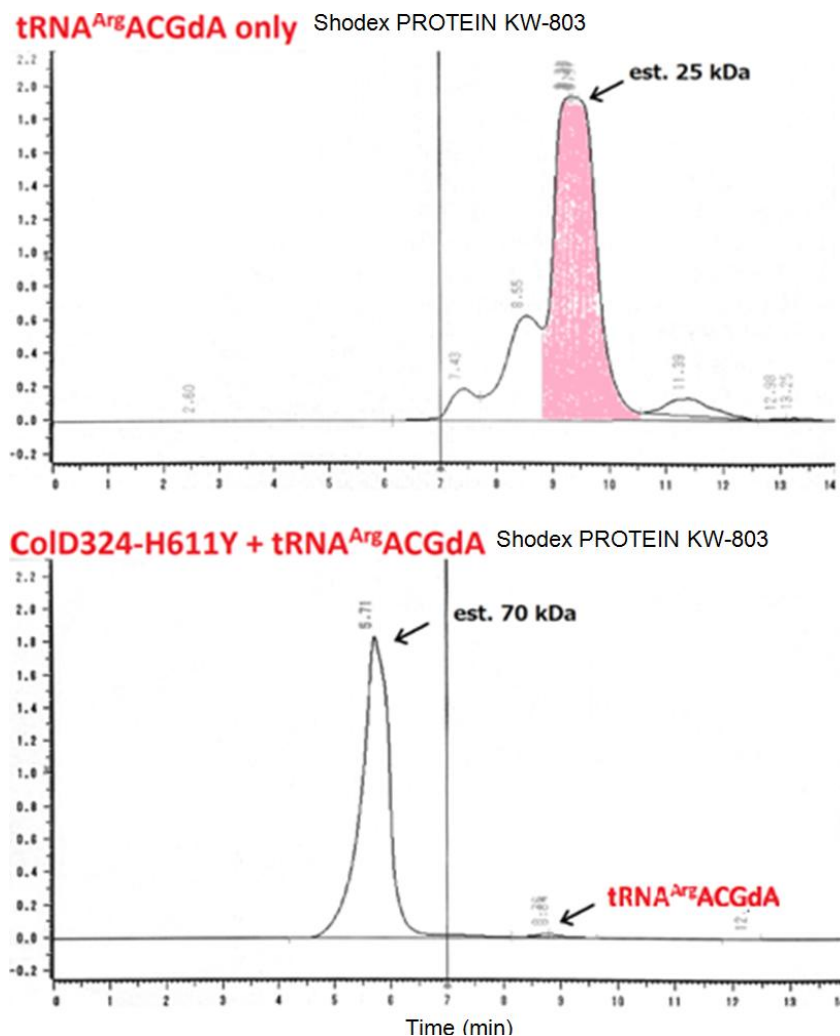


Fig. 3-14 tRNA^{Arg}_{ACGdA} only および CoID324-H611Y と 4°C で 3 日間に共培養し、HPLC のゲルろ過カラムを用いて様子を調べた（カラム名：Shodex PROTEIN KW-803）
ゲルろ過の結果で、高分子量側にシングルピークが観察できたため、両者は結合し、tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物も分解されていないことが推定された。縦軸は A280 により検出され、横軸は溶出時間（min）。

4°C の静置条件下でも、共結晶を形成する前に基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物が分解されてしまい、CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}_{ACG} はやはり安定な複合体を得るのが難しいと結論された。そこで、CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}_{ACG}dA 転写産物 (Fig. 3-14 にピンク色で示したピーク画分) の組み合わせで、共結晶化スクリーニングで 1/2 Crystal Screen D9 (0.1 M Zinc acetate, 0.05 M Sodium cacodylate, pH 6.5, 9% PEG8000)の条件下で小さい結晶を観察した。その後、サンプルの濃度や結晶化の沈殿剤濃度、および buffer の pH などを変えて大きな結晶が出てきた。4°C で結晶化したときの条件を以下に示した。(変更点を赤で標記した)

- (1) サンプル濃度 **10 mg/mL**, 1/2 Crystal Screen D9 (0.1 M Zinc acetate, 0.05 M **Tris-HCl**, pH **7.8**, **5%** PEG8000)
- (2) サンプル濃度 **5 mg/mL**, 1/2 Crystal Screen D9 (0.1 M Zinc acetate, 0.05 M **CAPSO**, pH **9.4**, **6%** PEG8000)
- (3) サンプル濃度 **5 mg/mL**, 1/2 Crystal Screen D9 (0.1 M Zinc acetate, 0.05 M **CAPSO**, pH **9.4**, **5%** PEG8000)
- (4) サンプル濃度 **5 mg/mL**, 1/2 Crystal Screen D9 (0.1 M Zinc acetate, 0.05 M **CAPSO**, pH **9.8**, **6%** PEG8000)
- (5) サンプル濃度 **5 mg/mL**, 1/2 Crystal Screen D9 (0.1 M Zinc acetate, 0.05 M **CAPSO**, pH **9.8**, **7%** PEG8000)
- (6) サンプル濃度 **5 mg/mL**, 1/2 Crystal Screen D9 (0.1 M Zinc acetate, 0.05 M **CAPSO**, pH **10.2**, **5%** PEG8000)

結晶の写真を (Fig. 3-15) に示した。

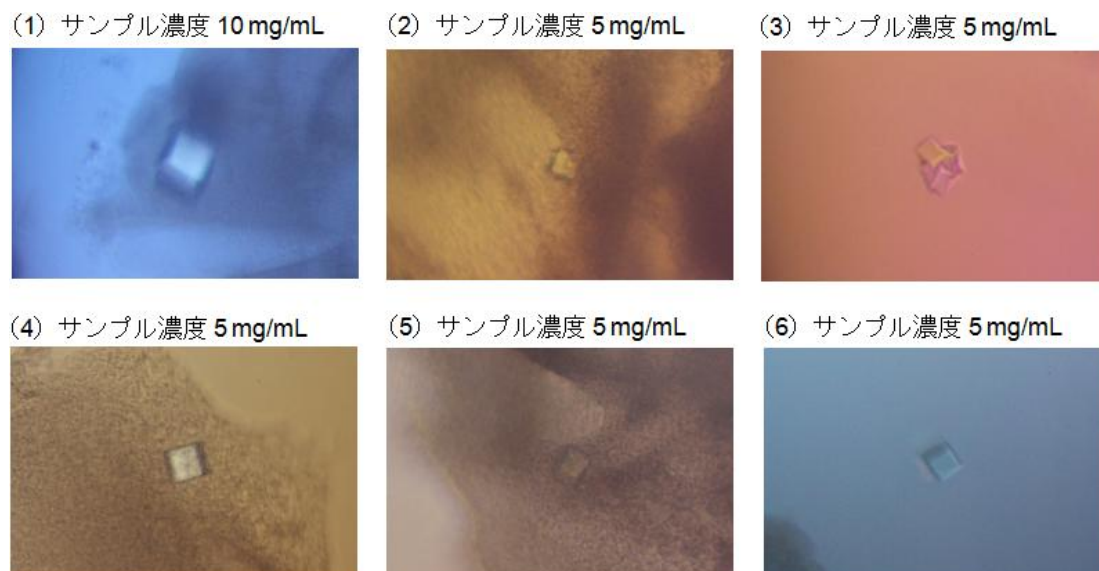


Fig. 3-15 tColD324-H611Y と tRNA^{Arg}ACGdA 転写産物を混ぜて共結晶化スクリーニングをし、4°C で培養し、結晶化溶液 1/2 Crystal Screen D9 の条件を少し変えて観察した結晶。

また、同じく ColD324-H611Y と tRNA^{Arg}ACGdA 転写産物の組み合わせで、共結晶化スクリーニングをもう一度やり直し、結晶条件を **20°C** で行ったところ、いくつかの条件下で結晶が観察された。結晶化条件を以下に示した。

(1) サンプル濃度 **8 mg/mL**, MemGold B5 - **1st** (0.1 M Magnesium Chloride, 0.03 M Tris-HCl, pH 8.2, 19% PEG4000)

(2) サンプル濃度 **8 mg/mL**, MemGold B5 - **2nd** (0.1 M Magnesium Chloride, 0.03 M Tris-HCl, pH 8.2, 19% PEG4000)

(3) サンプル濃度 **8 mg/mL**, MemGold B5 - **3rd** (0.1 M Magnesium Chloride, 0.03 M Tris-HCl, pH 8.2, 19% PEG4000)

(4) サンプル濃度 8 mg/mL, MemGold D4 (0.2 M Calcium Chloride, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 44% PEG400)

(5) サンプル濃度 8 mg/mL, MemGold F8 (0.1 M Sodium Chloride, 0.005 M Magnesium Chloride, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 30% PEGMME2000)

(6) サンプル濃度 8 mg/mL, PEG/Ion A5 (0.2 M Calcium Chloride, 20% PEG3350)

結晶の写真を (Fig. 3-16) に示した。

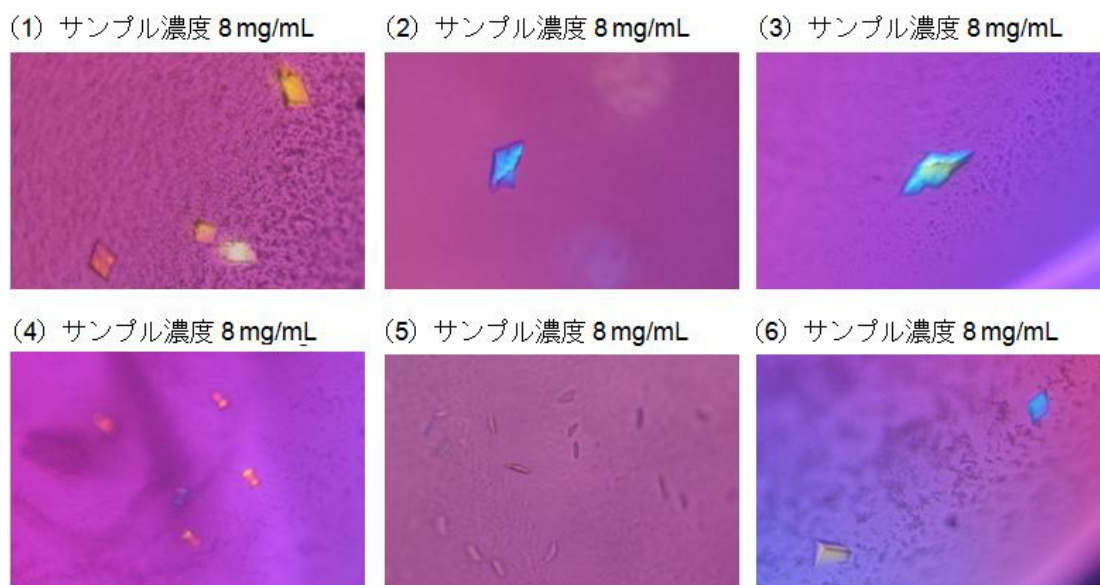


Fig. 3-16 CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}ACGdA 転写産物を混ぜて共結晶化スクリーニングをし、20°C で培養し、観察された結晶。

以上の条件で観察した結晶を拾って SPring-8 で X 線回折実験を行った。しかし、すべての結晶においてコリシン D の活性中心に tRNA^{Arg}ACGdA の電子密度が観察されなかったため、コリシン D324-H611Y の単体結晶であることが分かった。

以上の実験により、CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}ACGdA 転写産物を混合して (ただし沈殿剤は入っていない) ゲルろ過クロマトグラフィーにかけると、単

一ピークとなることが観察されたが、共結晶化スクリーニングではコリシン D324-H611Y の単体結晶しか得られなかった。tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物について、tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物だけをゲルろ過分析すると、4つのピークが現れた (Fig. 3-14)。 *In vitro* 転写を用いて作製した tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物は、転写が不完全となるために 3' 末端に 1 または 2 塩基の差が現れることがある。tRNA^{Arg}_{ACGdA} をゲルろ過カラムに通したとき、これに由来する retention time の差が異なる複数のピークが現れると考えた。そこで、ピンク色を示したピークの画分だけを回収し、共結晶化スクリーニングで用いたが、各ピークを完全に分離できていないために、末端の長さが違う tRNA^{Arg}_{ACGdA} が微量混ざっていたと考えた (Fig. 3-14)。また、CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物を混合してゲルろ過をかけた結果により、複合体に相当する単一ピークが観察できたが、よく見るとピークは対称の形ではないため、CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}_{ACGdA} は単一の形で結合していないと考えた (Fig. 3-14)。さらに、基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物のアデノシンは、すべてデオキシ化したもので、tRNA^{Arg}_{ACGdA} の立体構造が不安定あるいは歪みが生じる可能性もある。以上の結果に加え、共結晶化をするときに沈殿剤なども入っており、CoID324-H611Y と tRNA^{Arg}_{ACGdA} は安定な結合状態で存在できず、共結晶ができないと考えた。一方で、特定の結晶条件下では、沈殿剤などの影響で tRNA^{Arg}_{ACGdA} が離れ、単体 CoID324-H611Y タンパク質の方はコンパクトな構造を持っているため、CoID324-H611Y の単体結晶が再現良く観察された。

3-3-4 化学修飾した基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA38} を用いたコリシン D324-H611Y との共結晶化

これまで用いた tRNA^{Arg}_{ACG} および tRNA^{Arg}_{ACGdA} は *in vitro* 転写法で得られた転写産物である。*In vitro* 転写法では、特定部位のアデノシンをデオキシ化することが不可能であるため、すべてのアデノシンをデオキシ化し、コリシン D に切断されない tRNA^{Arg}_{ACGdA} を作製した。しかし、3-3-3 に述べたように、*in vitro* 転写法を用いて得られた基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} 転写産物は、転写反応が不完全に進んだため、転写産物である tRNA^{Arg}_{ACGdA} の末端に数個塩基の差が生じる可能性があった。そこで、tRNA の切断部位の 5' 側に相当する 38 位の A だけをデオキシ化した化学合成 tRNA^{Arg}_{ACGdA38} を用い、コリシン D324-H611Y と共結晶化を試みた。tRNA^{Arg}_{ACGdA38} は、すべてのアデノシンをデオキシ化したものと比べると、より安定的な立体構造が得られ、*in vitro* 転写産物のように末端に数塩基の差が生じる確率も減らせると考えた。コリシン D324-H611Y と化学修飾した基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA38} を混ぜて共結晶化スクリーニングをし、20°C および 4°C の条件下で静置してみた。しかし、残念ながら両方とも結晶の観察ができなかった。基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA38} は、製品が化学的に純粋ではなく、HPLC にかけてと収量がロスして濃度が上がられなくなるため、精製しなかった。共結晶が得られなかった理由として、この純度の問題があったと考えられた。

3-3-5 コリシン D に切断されにくい基質 tRNA^{Arg}_{CCU} 転写産物を用い、コリシン D324-H611Y との共結晶

矢嶋らは、ImmD を除いたコリシン D の最小活性ドメイン ColD595 を用い、大腸菌 tRNA^{Arg} の 4 種類のアソクセプター (tRNA^{Arg}_{CCG}, tRNA^{Arg}_{ICG}, tRNA^{Arg}_{CCU}, tRNA^{Arg}_{U*CU}。I は inosine であり、U*は U の修飾塩基 5-メチルアミノメチルウリジンである) を含む全 tRNA に対する切断活性を Northern hybridization で確認した (Fig. 3-17) [Yajima S et al., 2004]。

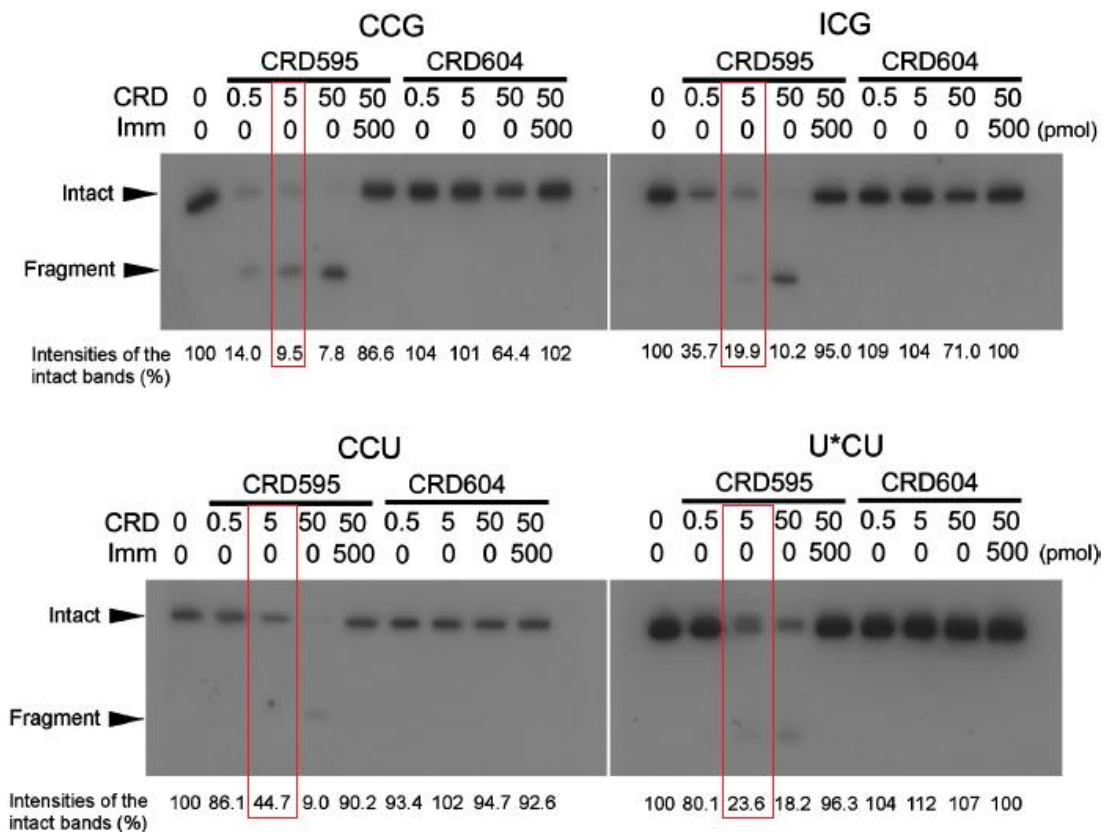


Fig. 3-17 ImmD を除いたコリシン D の最小活性ドメイン ColD595 を用い、大腸菌 tRNA^{Arg} の 4 種類のアソクセプターに対する切断活性を Northern hybridization で確認した結果

5 pmol の ColD595 が存在する条件下で、残された (分解されていない) intact バンドの濃さを比べ、tRNA^{Arg}_{CCU} は最も切断されにくい (赤囲み)。

[Yajima S et al., 2004]から転載

この時、5 pmol の ColD595 を用いた反応で、切れ残った intact な $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{CCG}}$, $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ICG}}$, $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{CCU}}$, $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{U}^*\text{CU}}$ のバンドの濃さは、それぞれ 9.5%, 10.2%, 44.7%, 23.6% であり、 $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{CCU}}$ が最も切断されにくかった。そこで、*in vitro* 転写法で基質 $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{CCU}}$ 転写産物を作製してコリシン D324-H611Y との共結晶化スクリーニングをし、20°C および 4°C の条件下で静置してみた。しかし、結晶は観察されなかった。Fig. 3-17 に矢嶋らの実験では、大腸菌 W3110 株の細胞内の 10 μg total RNA に対し、5 pmol の ColD595 を加えて反応した。それでも、44.7% の基質 $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{CCU}}$ しか残されず、55.3% の基質 $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{CCU}}$ が分解されたことが分かった。共結晶化スクリーニングの条件では、基質 : 酵素はモル比 1.2 : 1 の比率で混合したことから、コリシン D の割合が大幅に上昇し、基質 $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{CCU}}$ の分解反応がより激しく進んだと考えられた。共結晶化スクリーニングでは活性中心変異体コリシン D324-H611Y を用いたが、(Fig. 3-12) の結果により、4°C の静置条件下で 3 日間で基質 $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACG}}$ 転写産物の分解が相当進んでしまった。コリシン D324-H611Y の残存活性でも十分に基質 $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{CCU}}$ 転写産物は切断されると考えられた。4°C の静置条件下で、活性中心変異体コリシン D324-H611Y を用い、切断されにくい基質 $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{CCU}}$ 転写産物との組み合わせは、基質が分解される前に安定的な複合体結晶が得られると期待したが、結果として、共結晶は得られなかった。

3-3-6 コリシン D595 変異体の情報を用いた結晶化

高橋一敏は、D-CRD の中で酵素活性に関与することが疑われた 6 個アミノ

酸をそれぞれアラニンに置換したコリシン D 変異体を作製し、H611Y 変異体とともにスポットテストにより、野生型コリシン D595 を基準として、相対殺菌活性を測定した (Fig. 3-18) [高橋一敏、博士論文]。その結果、K608A、H611Y、W679A の変異体で、殺菌活性が 1/20000 程度に低下し、K610A 変異体で、殺菌活性が 1/200 程度に低下した。また、D614A および S677A 変異体においては殺菌活性が 1/10 程度に低下したが、実際に触媒、もしくは基質の相互作用に参与しているのであれば、この程度の低下に止まるとは思えないことから、Asp614 および Ser677 は基質認識や触媒反応には直接関与しないと判断された。

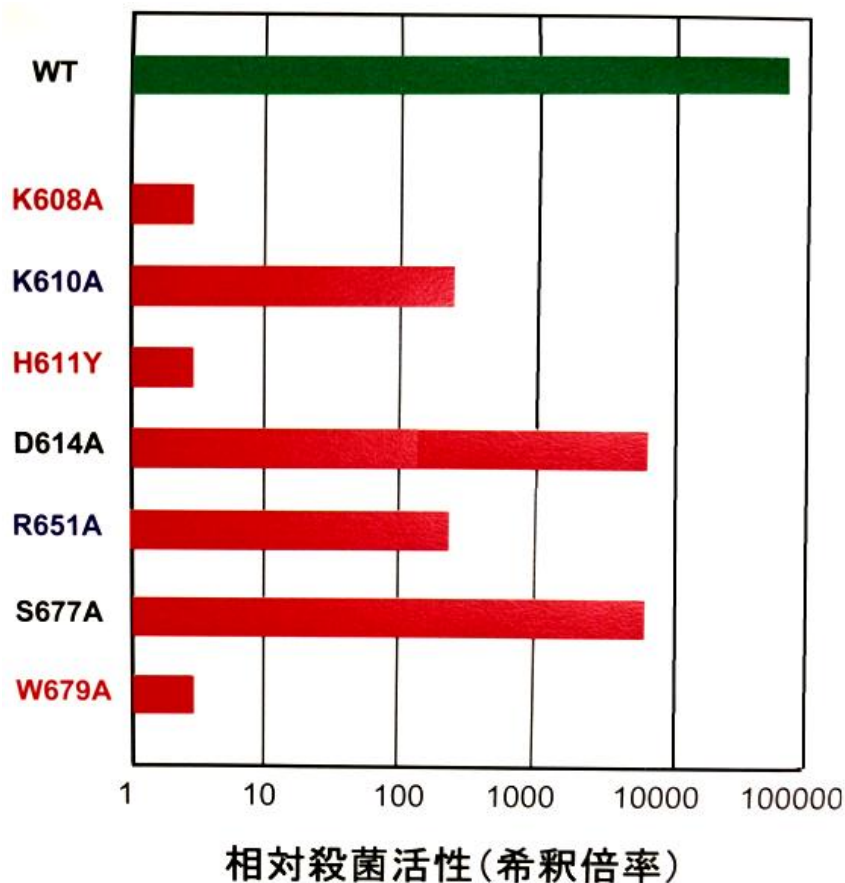


Fig. 3-18 D-CRDの中で酵素活性に関与することが疑われた6つのアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換したコリシン D 点変異体および当初より触媒残基と考えられていた His611 の H611Y 変異体の相対殺菌活性を野生型コリシン D と比較した。 [高橋一敏、博士論文]から転載

更に、高橋一敏は K608A、K610A、H611Y、W679A の変異体を用いてコリシン D の酵素反応速度論量の解析を行った[高橋一敏、博士論文]。そこではそれぞれのコリシン D595 変異体と基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物を 37°C で 10 分間反応させ、10%変性ゲルにて電気泳動を行い基質の未切断片と切断片を分離し、イメージングプレートを用いて各断片に由来する放射エネルギーが定量された (Fig. 3-19)。しかし、各断片に由来する放射エネルギーを定量した実験方法では、大きな誤差が生じやすいため、コリシン D595 の正しい酵素反応速度を反映した結果が得られたとは言えない。

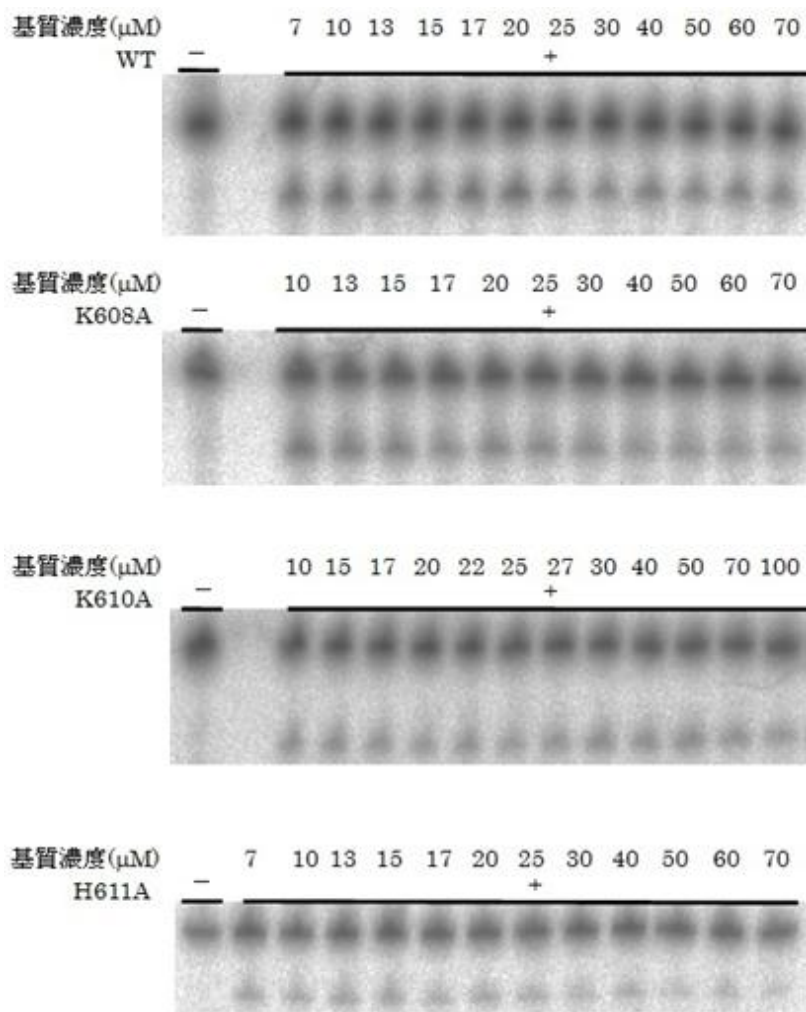


Fig. 3-19 所定の基質 tRNA 濃度下で、コリシン D595 および変異体と反応した結果

10%変性ゲルにて電気泳動を行い基質の未切断片と切断片を分離し、イメージングプレートを用いて各断片に由来する放射エネルギーを定量した。

[高橋一敏、博士論文] から転載

そこで、HPLC のゲルろ過分析により、より正確なコリシン D595 の酵素反応速度論量解析を次の方法で行った。それぞれのコリシン D595 と基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物を 37°C で 10 分間反応させ、終濃度 100 mM citrate phosphate buffer pH 3.0 を加えることで、反応を止めた。その後 HPLC のゲルろ過カラムに通して、基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物の未切断片と切断片を分離し、ピークの面積によってコリシン D の酵素反応速度論量を計算した (Table 3-1)。その結果、CoID595-K608A の変異体の K_m 値は野生型コリシン D595 と比べ、約 30 倍上昇し、 k_{cat} は約 1/160 になったため、K608 は基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物の結合に関与すると考えられた。CoID595-K610A の変異体の K_m 値は野生型コリシン D595 と比べ約 3.4 倍だけ上昇し、実験の誤差などを含めて考えると、K610 は基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物の結合に顕著な影響を与えないと考えられた。

Table 3-1 コリシン D595 と変異体の酵素反応速度論量の解析

	K_m (μM)	k_{cat} (1/min)
CoID595 WT	6.67	155
CoID595-K608A	200	0.98
CoID595-K610A	22.73	9.29
CoID595-H611A	8.33	0.50

また、 k_{cat} 値の結果により、3 つの変異体 (CoID595-K608A, CoID595-K610A, CoID595-H611A) とともに基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物の切断活性が低下したことが分

かった。特に H611Y 変異体は K_m を大きく変えず、 k_{cat} のみ大きく減少させるので、触媒中心の可能性が高い。CoID595-W679A 変異体についても酵素反応速度論量を測定したが、基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物濃度 : CoID595-W679A 酵素濃度 = 3 : 1 にしてはじめて活性が確認された。反応速度論量を求める上での前提となる基質過剰量を維持できない程度にまで活性が低下しているため、CoID595-W679A 変異体については、活性低下の程度が大きすぎ、定常状態における速度論量の決定は不可能であると判断した。高橋一敏および高橋聖矢は、コリシン D の W679 は基質の結合に関与することより、コリシン D が基質 tRNA を認識し、結合した後、tRNA の切断部位の 5' 側に位置する塩基であり A38 をフリップアウトにより水溶液中に露出させ、コリシン D の H611 によるプロトンの受け取りを促進していると考察していた。

以上の酵素反応速度論量の結果により、CoID595-K610A-H611A 二重変異体の活性は、CoID595-H611A 変異体より低下すると予想され、CoID313-K610A-H611A タンパク質と基質 tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物との共結晶が得られると期待した。そこで、CoID313-K610A-H611A タンパク質を作製して精製し (Fig. 3-20)、tRNA^{Arg}_{ACG}dA および tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物との共結晶化を試みた。4°C の条件下で共結晶化スクリーニングを試みたが、残念ながら両方とも結晶の観察ができなかった。また、基質 tRNA を切断する活性を更に低下させるため、CoID313-K608A-K610A-H611A 三重変異体も作製し、精製を行ったが、タンパク質を精製する途中でサンプルの殆どがアグリゲーションを起こしてしまった。このことから、CoID313-K608A-K610A-H611A 三重変異体を用いた基

質 tRNA との共結晶化を断念した。Lys、His とともに電荷をもったかさ高いアミノ酸で、それを 3 つとも体積の小さい疎水的な Ala に変えたことで、活性中心付近の構造と性質を大きく変えすぎたことが不溶化の原因かもしれない。

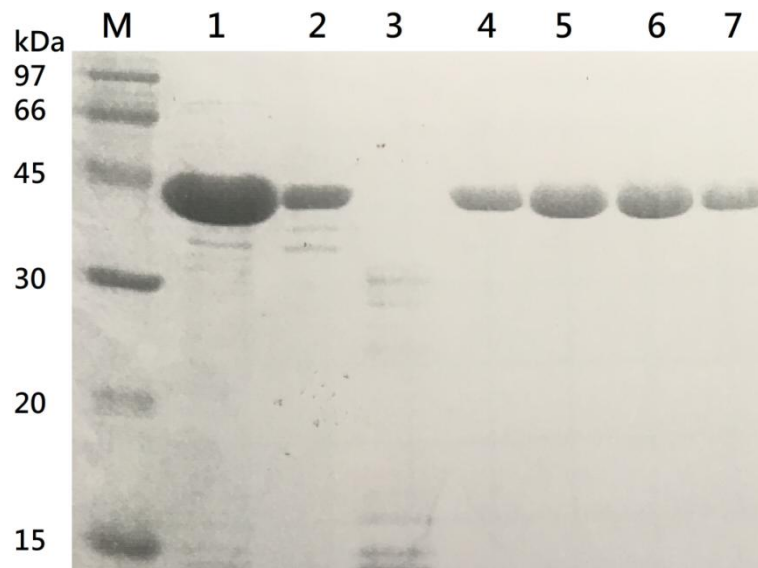


Fig. 3-20 ColD313-K610A-H611A 二重変異体を精製した結果 (SDS-PAGE)
この結果に基づいて、MonoQ カラム後の画分 4~7 のサンプルを収集し、濃縮した後に基質アナログ tRNA^{Arg}ACGdA および tRNA^{Arg}ACG との共結晶化を試した。

M はマーカー。

3-3-7 総合考察

3章で試したコリシン D および基質 tRNA の組み合わせを (Table 3-2) にまとめた。様々な条件や組み合わせ方を試したが、本研究ではコリシン D/基質 tRNA 複合体の結晶が得られなかった。

コリシン D の tRNA 切断活性が非常に高く、また共結晶化の条件下で、コリシン D の濃度が非常に高く (コリシン D : 基質 tRNA のモル比 = 1 : 1.2)、活性中心に変異を導入しても切断活性を失くすことが出来なかった。また、二重変異体では溶解度が大幅に低下した。一方で、基質 tRNA の改造についても色々と着手したが、やはり共結晶が得られなかった。基質 tRNA は一旦切断されると、不安定な構造となり、切断直後のコリシン D との複合体は得られず、完全に分解される運命を迎えた (Fig. 3-12)。

(Fig. 0-7) に示したコリシン D-CRD/ImmD の複合体結晶構造および矢嶋らの結果[Yajima S et al., 2004]により、コリシン D-CRD の表面は正電荷を持っており、負電荷を持つ ImmD および基質 tRNA と結合できる。つまり、コリシン D の活性ドメインはポケット構造のように、しっかりと基質 tRNA と結合することではなく、表面の正負電荷によって結合する形になっていると考えた。D-CRD/基質 tRNA の複合体結晶が得られないことは、安定に結合している状態を維持しにくいことを示唆する。

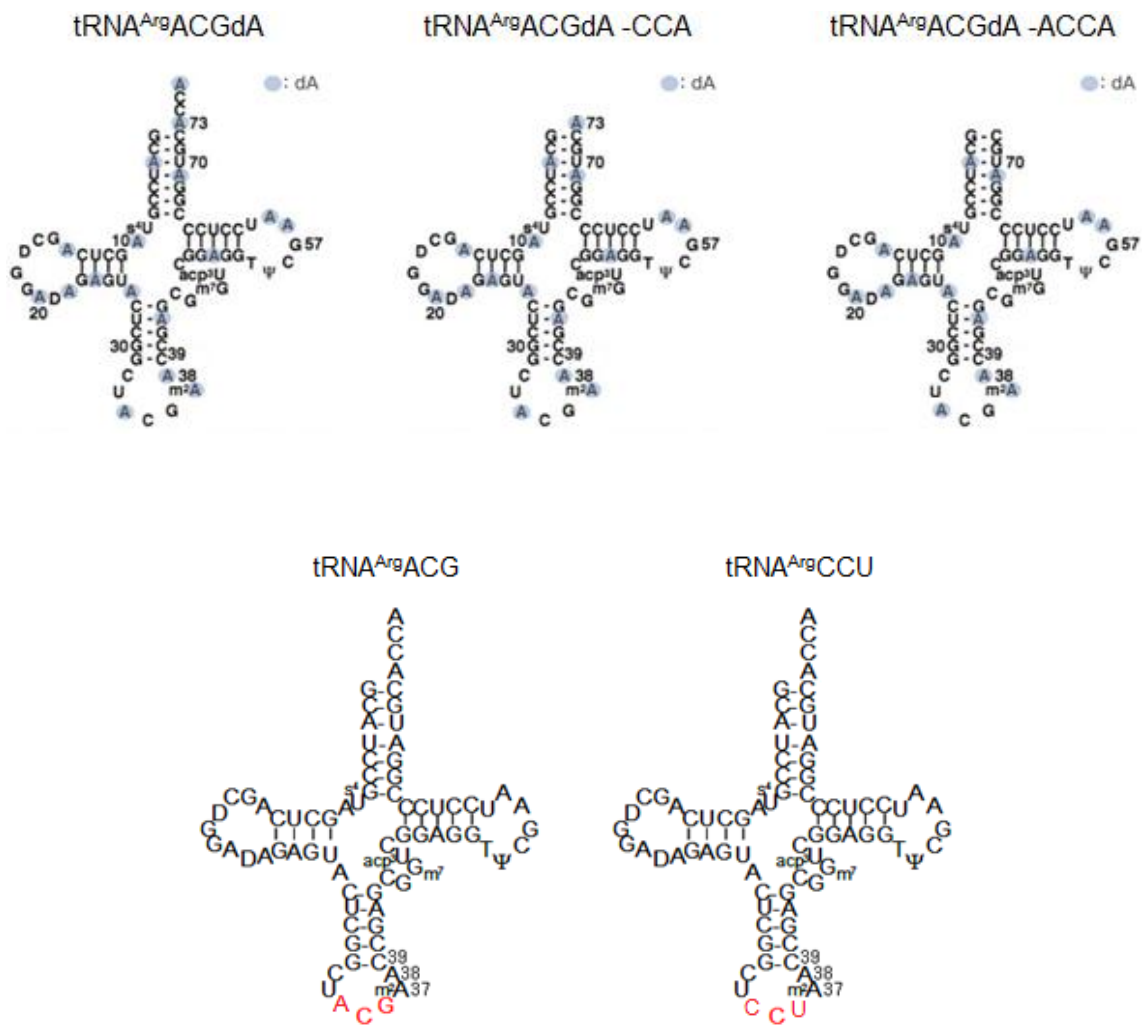
一方で、基質 tRNA の全てのアデニンをデオキシ化した転写産物 tRNA^{Arg}_{ACGdA} は、コリシン D により全く切断されないことが分かったが、それでも共結晶が得られなかった。可能な理由は、全てのアデニンをデオキシ化し

た $\text{tRNA}^{\text{Arg}}_{\text{ACGdA}}$ では、refolding した時に構造の歪みが生じたことである。歪みが生じて複数成分になってしまい、コリシン D と様々な結合状態をとっているため、共結晶が現れなかったと考えられた。Arginyl-tRNA 合成酵素 (略称 ArgRS) と tRNA^{Arg} の共結晶が報告されている [Stephen P et al., 2018]。ArgRS は tRNA 全体 (identity site を含め) を認識していることがコリシン D と大きく異なる。コリシン D は、tRNA の切断部位であるアンチコドンループ近傍の塩基、或いは構造を認識すると予想されることも共結晶が現れない理由の一つと考えられた。

Table 3-2 3章で試したコリシンD および基質 tRNA の組み合わせ

	ColicinD	tRNA	結晶化温度	結果
3-3-1	CoID591	tRNA ^{Arg} ACGdA 転写産物	20°C / 4°C	結晶出ず
↓tRNA ^{Arg} ACGdA 転写産物の 3'末端を削った(- ⁷⁴ CCA ⁷⁶ , - ⁷³ ACCA ⁷⁶)				
3-3-1	CoID591	tRNA ^{Arg} ACGdA 転写産物 (- ⁷⁴ CCA ⁷⁶ , - ⁷³ ACCA ⁷⁶)	20°C / 4°C	結晶出ず
↓コリシンDの分子量が小さすぎてパッキングしにくいいため、 配列を検索してみた結果により、コリシンDのN末端を延ばした				
3-3-2	CoID309	tRNA ^{Arg} ACGdA 転写産物	20°C	結晶出ず
3-3-2	CoID418	-	-	CoID418 が分解された
3-3-2	CoID313	tRNA ^{Arg} ACGdA 転写産物	20°C / 4°C	CoID313 単体結晶
3-3-2	CoID313	tRNA ^{Arg} ACG 転写産物	20°C / 4°C	CoID313 単体結晶
↓コリシンDの切断活性を落とすため、活性中心変異体 H611Y を用いた				
3-3-3	CoID313-H611Y	tRNA ^{Arg} ACGdA 転写産物	20°C / 4°C	結晶出ず
3-3-3	CoID313-H611Y	tRNA ^{Arg} ACG 転写産物	20°C / 4°C	結晶出ず
3-3-3	CoID324-H611Y	tRNA ^{Arg} ACGdA 転写産物	20°C / 4°C	CoID324 単体結晶
3-3-3	CoID324-H611Y	tRNA ^{Arg} ACG 転写産物	20°C / 4°C	結晶出ず
↓化学修飾した基質 tRNA ^{Arg} ACGdA38 を用いた				
3-3-4	CoID324-H611Y	tRNA ^{Arg} ACGdA38	20°C	結晶出ず
↓コリシンDに一番切断されにくい基質 tRNA ^{Arg} CCU 転写産物を用いた				

3-3-5	CoID324-H611Y	tRNA ^{Arg} CCU 転写産物	20°C / 4°C	結晶出ず
↓コリシン D の活性中心二重変異体 CoID313-K610A-H611A を用いた				
3-3-6	CoID595 (K610A-H611A)	tRNA ^{Arg} ACGdA 転写産物	4°C	結晶出ず
3-3-6	CoID595 (K610A-H611A)	tRNA ^{Arg} ACG 転写産物	4°C	結晶出ず



第4章 tRNAの切断と細胞死誘導との関係の解析

4-1 目的

RNAは細胞の生存、および様々な細胞機能の維持に関わる必須である。RNAの変異や予期せぬ分解は細胞に対しては有害であり、時として細胞死をもたらす。こうした事態を避けるため、細胞には異常なRNAを排除するシステム、すなわち「品質管理機構」が備わっている。tRNAは、mRNA上のコドンに対応するアミノ酸をリボソームへと運搬し、ペプチド結合を形成する重要な役割を持ち、細胞の生育に必須である。一般的にはtRNAは安定な分子として知られているが、アミノ酸を結合する3'末端やアンチコドンループは外部へとむき出しになっており、種々のヌクレアーゼや、コリシンE5やコリシンDなどのtRNAを標的とするリボヌクレアーゼによる分解を受けやすい。tRNAは生育に必須であることから、コリシンE5やコリシンDによって必須なtRNAのいくつか切断されて失われ、タンパク質合成が停止すると、半ばアプリアリに、感受性菌に対して直ちに細胞死を誘導すると考えられてきた。これは、コリシンE5やDを数分程度作用させただけで、感受性菌のコロニー形成能(c.f.u)が顕著に低下することからくる「印象」も影響していると思われる。しかし、コロニーを形成しないことが細胞の「死」を意味するとは限らない。これは、今日話題となっているViable but non-culturable (VBNC)の例からも分かる通りである。すなわち、tRNAを切断された感受性菌は、生きてはいるがコロニー形成能を失っている可能性もある。

酒井英子らは、温度感受性コリシンD（コリシンD (Y609N)）を用いて上記仮説の実験的検証を試みた。この変異型コリシンを用いることで、感受性菌内tRNA切断の継続時間を人為的にコントロールできる。その結果、tRNA^{Arg}_{ICG}が完全に切断されているにも関わらず、感受性菌は一定時間静菌的生育停止状態（bacteriostatic state）を維持することが分かった[Sakai F et al., 2015]。また、予備的ではあるが、この静菌的生育停止に、transfer-messenger RNA (tmRNA) を介したリボソームレスキューシステム（*trans*-translation）が関与することが示唆された（Fig. 4-1）。tmRNAは、tRNAおよびmRNAを擬態したドメイン構造を持つRNAである。リボソームがmRNA上で停滞すると、tmRNAはSmpBと複合体を形成し、機能停止状態になった、リボソームのA部位に入る。伸長中のペプチドにアラニンを付加したあとにP部位に移動し、自身のアンチコドン部位にある配列をリボソームに読ませる。これにより、伸長ペプチドのC末端に分解タグを付加したのち、ペプチド合成を終了させることで、mRNAの3'末端において停滞したリボソームをレスキューする*trans*-translationを行う。

そこで本章では、酒井が行った上記結果を受け、これを更に検証することを目的とした。酒井が使用した温度感受性コリシンは、30°Cでも野生型と比べて殺菌の比活性が大きく低下していたので、これを用いて得た結論を野生型に敷衍できる確証はない。そこで、野生型コリシンDを使用した検証が必須と考えられたが、前述の通り、c.f.u.は半日以上培養した後のコロニー形成能という最終的命運を観察するものであり、コリシン処理中の菌の状態を判定するものではない。そこで、ここでは野生型コリシンDを用い、生死判定にLIVE/DEAD染

色法を適用することとした。

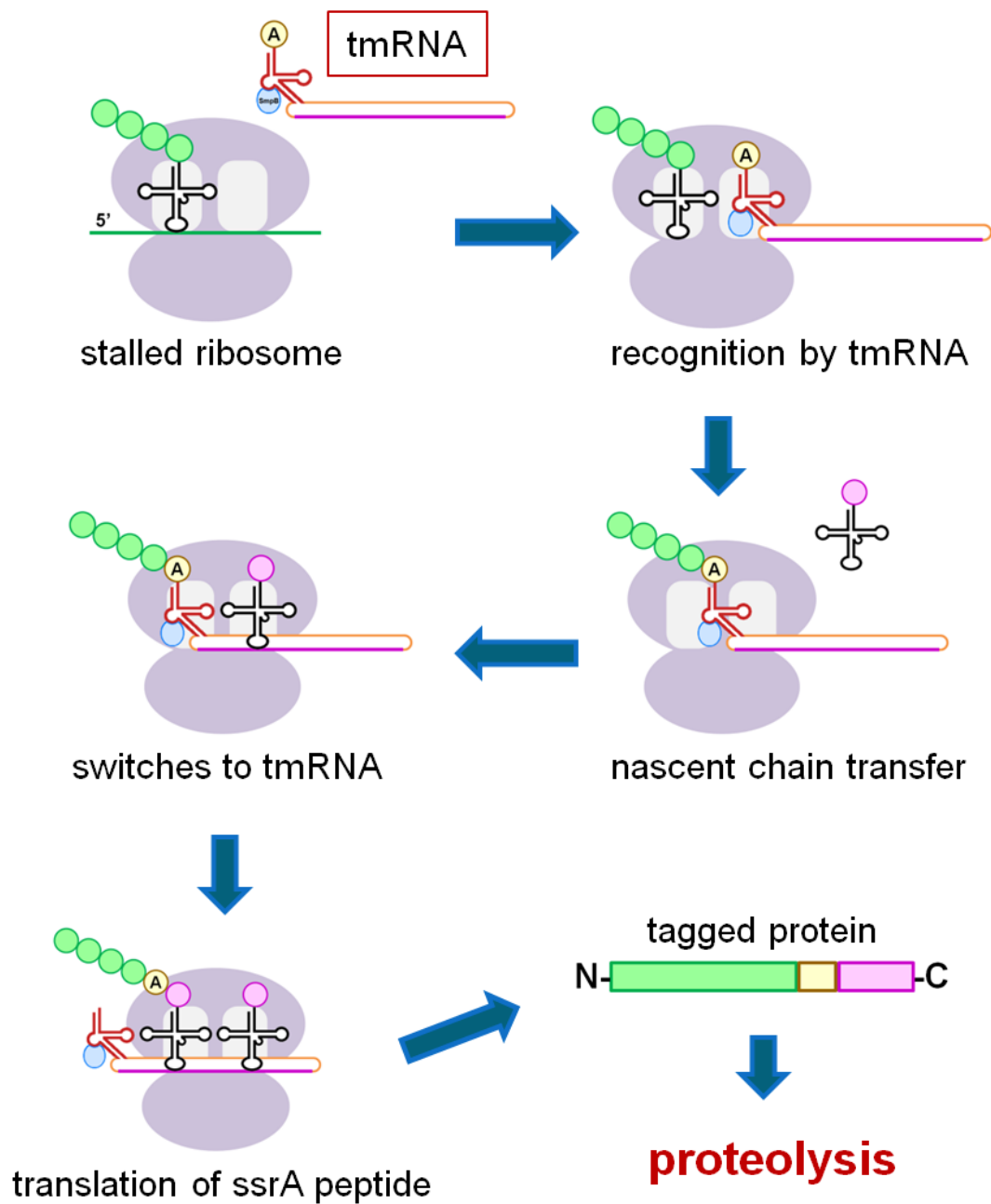


Fig. 4-1 tmRNA と SmpB により、mRNA の 3' 末端において停滞したリボソームをレスキューする *trans*-translation を行う。

4-2 材料と方法

4-2-1 使用した株、プラスミド

翻訳関連遺伝子の各破壊株は、Keio collection[Baba T et al., 2006]のものを用いた。これら破壊株および親株である大腸菌 K-12 BW25113 株は National BioResource Project (NBRP), NIG, Japan から分与された。プラスミドからの tmRNA の発現には、*ssrA*、あるいは *ssrA* にコードされた分解シグナルに変異を導入したものを pMW118 にクローニングしたプラスミドを用いた。これらは、それぞれ pMW*ssrA*, pMW*ssrA*-DD と名付けられている[Nakano H et al., 2001]。Δ*ssrA* 株[Komine Y et al., 1994]、およびプラスミド pMW*ssrA* と pMW*ssrA*-DD は姫野俵太教授（弘前大学）より恵与された。

4-2-2 全長コリシン D/ImmD 複合体の発現および精製

コリシン D/ImmD 複合体および温度感受性コリシン D/ImmD 複合体を以下の方法で粗精製した。ColD-Km（野生型の ColD-CA23 にカナマイシン耐性マーカーを付けたプラスミド）[Tomita K et al., 2000]にコードされたコリシン D の遺伝子に対し、点変異を導入することで 609 番目の Tyr が Asn へと置換 (TAT→AAT) されたコリシン D を発現するプラスミドが妻鳥奈津子により作製されていた。このプラスミドおよび野生型コリシン D を作る ColD-Km を導入した *E. coli* RR1 株を、10 mL の L-broth (1% Bacto tryptone (Difco), 0.5% Yeast extract (Difco), 0.5% NaCl (国産化学))に植菌し、37°C、16 時間培養することで前培養とした。

5 Lのコブ付き三角コルベンにて調製した1 LのL-brothに前培養液10 mLを植菌し、37°Cで振盪培養することで本培養とした。この時、消泡剤を添加することで培養時の泡立ちにより嫌氣的になることを防いだ。一定時間ごとに波長660 nmにおける濁度を測定し、 $OD_{660} \approx 0.8$ になった段階でマイトマイシンCを終濃度が0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加え、SOS誘導をかけた。その後、37°C、3時間培養し、遠心(4°C、9000 rpm、5分)により集菌した。集菌した菌体を全体で30 mLになるように20 mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.0)に懸濁し、氷冷しながら超音波破碎機により菌体を破碎した。菌体破碎終了後、遠心(4°C、15,000rpm、30分)により不溶性画分を除去し、上清を回収した。上清にpolyethyleneimineを添加して核酸を沈殿させた後、溶液を20 mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.0)に対して透析した。得られた上清を同バッファーで平衡化したDEAE 650Sカラムにロードし、KClの濃度勾配によりカラムからコリシンD/ImmD複合体を溶出させた。

4-2-3 野生型および温度感受性コリシンDの生育阻害活性の測定方法

E. coli RR1をL-brothを入れた複数の試験管に植菌し、30°Cで振盪培養した。 OD_{660} が0.4に達した段階で、試験管を氷上に移すことで生育を一時的に停止させた。全ての培養液の濁度が0.4に揃った段階で、順次30°Cに移すことで培養を再開した。5分間培養した後、4-2-2で精製した野生型および温度感受性コリシンDを、同等の非活性となるように、それぞれ終濃度で5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した後、30°Cで振盪培養を続けた。30分間ごとに

培養液をサンプリングし、これを L-broth を用いて段階希釈した。この希釈液の一部をソフトアガー（0.75%アガーを含む L-broth）に混ぜた後、滅菌済みの空のディッシュに注ぎ込んで固化した。これらのディッシュを 42°C で一晩培養した後、形成されたコロニー数（c.f.u.）を測定した。コリシン D に対する各翻訳関連因子破壊株の耐性度（Extent of resistance）は以下の通り算出した。

Extent of resistance (%) = 100 x (コリシンを添加した各変異株の c.f.u.) / (コリシンを添加した野生株の c.f.u.)。

また、野生株および Δ ssrA 変異株の生存率（Viability）は以下の通り算出した。

Viability (%) = 100 x (コリシン添加時の c.f.u.) / (コリシン未添加時の c.f.u.)。

4-2-4 LIVE/DEAD 染色法

コリシン D、E3 および E5 を作用させた *E. coli* W3110 の経時的生存率変化を、以下の通り LIVE/DEAD 染色法（LIVE/DEAD Bac Light Bacterial Viability kit（Life Technologies））により測定した。終夜培養した *E. coli* W3110 を、10 mL の L-broth に 1%になるように植菌した。37°C で振盪培養し、660 nm における濁度が 0.4 に達した段階で試験管を氷上に移すことで生育を停止させた。全ての試験管培養液の準備が整った段階で、順次 37°C での培養を再開した。5 分間培養した後、各コリシンを加えた。ここで、各コリシンの添加重量に対する殺菌活性を測定し、同程度の殺菌活性を示す重量のコリシンを添加するようにした。各コリシンの殺菌活性（Killing activity）は以下通り算出した。

$$\text{killing activity} = -\ln (S/S_0)$$

ここで S はコリシン添加時の感受性菌の c.f.u.を、 S_0 はコリシン未添加時の感受性菌の c.f.u.を表す。

その後、30 分間ごとに培養液をサンプリングし、LIVE/DEAD Bac Light Bacterial Viability kit を用いて染色操作を行った。染色方法は添付のプロトコールに従った。その後、蛍光顕微鏡観察により視野下の生細胞・死細胞数を測定した。この際、各実験において 3 つの独立視野下での測定を行い、これを 3 回繰り返した。生存率 (Viability) は以下の通り算出した。

$$\text{Viability (\%)} = 100 \times (\text{生細胞数}) / (\text{全細胞数})。$$

4-3 結果

4-3-1 tRNA が切断された大腸菌細胞は、すぐに細胞死に至らない（酒井による実験）

本章の冒頭でも述べたが、酒井英子は温度感受性のコリシン D (Y609N) を用いて、tRNA 切断の継続時間（30°C）と生菌数（42°C にシフトアップして測定したコロニー形成数）との関係を検証した。このコリシン D (Y609N) は、活性中心残基と考えられる Lys608 および His611 の近傍に位置する Tyr609 を Asn へと置換したものであり、許容温度下（30°C）では感受性菌内での tRNA 切断活性を維持するが、非許容温度下（42°C）ではこれを失う（Fig. 4-2）[Sakai F et al., 2015]。

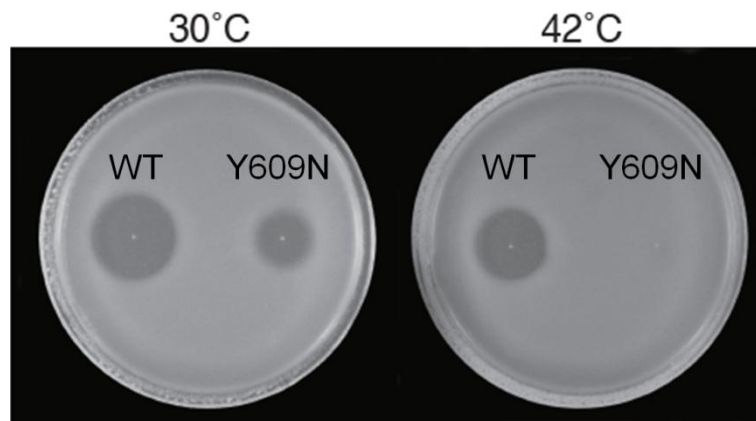


Fig. 4-2 野生型および温度感受性コリシン D（コリシン D (Y609N)）の活性の温度依存性

野生型および温度感受性コリシン D を、指示菌を重奏したプレートにスポットした後、図に示した温度で培養することでハローの形成を調べた。温度感受性コリシン D は、許容温度下（30°C）ではハローを形成するが、非許容温度下（42°C）では形成しなかった。

[Sakai F et al., 2015]から転載

そこで、30°C で一定時間感受性菌に作用させ、プレーティングを行った後、42°C で培養することでコリシンを失活させると共にコロニー形成能を測定した。その結果、野生型コリシン D の添加では、1 時間以内のプレーティングで c.f.u. が 1/1000 程度に低下した。一方で、温度感受性コリシン D を作用させた感受性菌では、c.f.u. は逆に若干増加した後、添加から 2 時間経過以降は一定の値を示した (Fig. 4-3)。

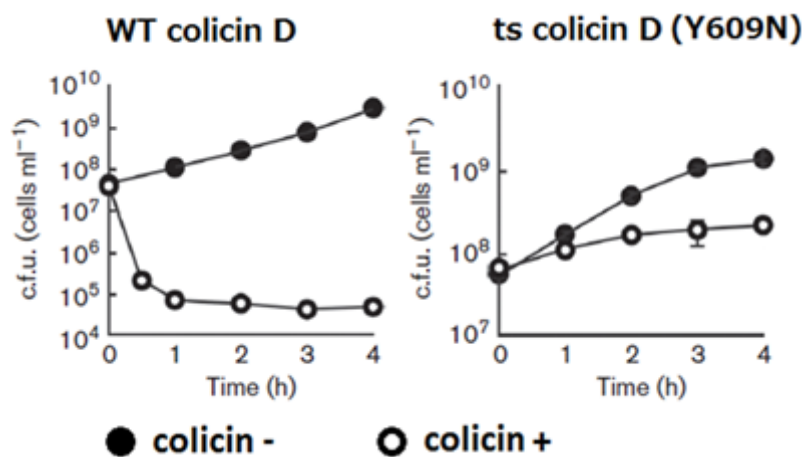


Fig. 4-3 野生型および温度感受性コリシン D に対する生菌率の比較 (一)
 (a) 野生型 (左図) および温度感受性型 (ts) コリシン D (右図) を作用させた感受性菌の生菌率を比較した。黒丸および白丸印は、それぞれコリシン添加、非添加時の生菌数を表す。野生型コリシン D の添加により、c.f.u. は約 1/1000 位程度に低下した。一方で、ts コリシン D の添加により、c.f.u. の値が一定に保たれることが分かった。

[Sakai F et al., 2015]から転載

すなわち、温度感受性コリシン D を添加してから 2 時間が経過した段階で、生育が静菌的に停止した。この時、野生型、温度感受性いずれのコリシン D でも、添加後 (30°C) 20 分の時点ですでに標的である tRNA^{Arg}_{ICG} は、完全に切断されていた (Fig. 4-4) [Sakai F et al., 2015]。

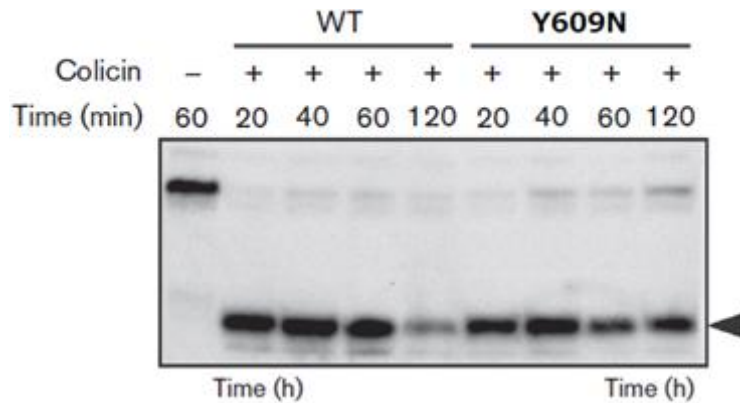


Fig. 4-4 野生型および温度感受性コリシン D に対する生菌率の比較 (二)
 $tRNA^{Arg}_{ICG}$ -specific probe を用いて、Northern hybridization を行った。野生型、温度感受性いずれのコリシン D でも、添加後 (30°C) 20 分の時点です
 でに標的である $tRNA^{Arg}_{ICG}$ は、完全に切断されていた。

[Sakai F et al., 2015]から転載

以上が、前任者の酒井英子により得られた結果の概要であるが、このことから、tRNA 切断は感受性大腸菌を速やかに殺菌するわけではないことが示唆された。すなわち、tRNA が完全に切断されても一定時間 (少なくとも 2 時間) は静菌的に生育停止が維持されており、野生型コリシンでは、その停止状態が継続するため、最終的に c.f.u.が低下することが分かった。

4-3-2 SmpB と tmRNA が感受性菌の静菌的生育停止の維持に必要である

前節の (Fig. 4-4) では、コリシン D によって必須な $tRNA^{Arg}_{ICG}$ は明らかに切断されており、タンパク質合成も停止しているはずである。しかし、それだけでは実は死ぬこと意味しないというのは重要な発見であった。では、その時リボソームはどういう状態で停止しているのだろうか? Arg コドンが来たところで A サイトが空白になっているのだろうか? また温度感受性コリシン D を作

用させたあと、培養温度をシフトアップしたとき、リボソームはどのように回復するのだろうか？そこで、リボソーム機能に関係するいくつかのストレス応答遺伝子の関与を検討した。ここでは、*smpB*, *arfA*, *relE*, *rtcB*, *yaeJ* の各遺伝子を欠損させた時のコリシン D 感受性を調べた (Table 4-1)。

Table 4-1 大腸菌のタンパク質翻訳に関連する因子

Factor	Description	Reference
ArfA	Alternative ribosome-rescue factor A (peptidyl-tRNA hydrolase).	[Shimizu Y 2012]
RelE	Toxic component of a type II toxin-antitoxin system, cleaving mRNA in the ribosomal A site.	[Pedersen K et al., 2003]
RtcB	RNA ligase that mediates the joining of broken tRNA-like stem-loop structures in case of tRNA damage.	[Tanaka N, Shuman S 2011]
SmpB	<u>Small Protein B</u> , A unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of tmRNA.	[Karzai AW et al.,1999]
YaeJ	Ribosome-associated protein in <i>E. coli</i> that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes.	[Handa Y et al.,2011]
tmRNA (SSrA)	<u>Transfer-messenger RNA</u> , also known as 10Sa RNA or its genetic name <u>SsrA</u> . The tmRNA forms a ribonucleoprotein complex together with SmpB, Elongation Factor Tu, and ribosomal protein S1.	[Keiler KC et al.,1996]

酒井英子は、温度感受性コリシン D による静菌的生育停止に、tmRNA が関与するかを調べるために、tmRNA 欠損大腸菌株 (Δ *ssrA* 株) に対してコリシン D

(Y609N)を作用させたところ、野生株とは異なり c.f.u.の低下が見られた。ここで、本研究でもあらためて $\Delta ssrA$ 株に対して温度感受性コリシン D を作用させた際の耐性度を測定し、実験の再現性を確認した (Fig. 4-5)。以上の結果は、tmRNA が存在しない細胞では、生育停止が維持できないことを示すものであり、この静菌的生育停止に tmRNA によるリボソームリサイクリングが関与することが考えられた。

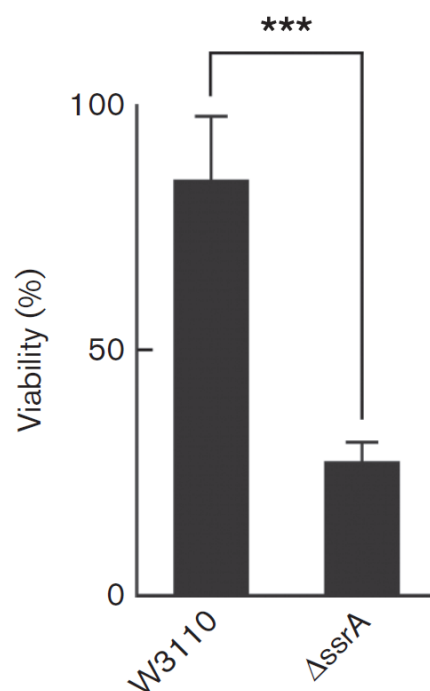


Fig. 4-5 tmRNA 欠損株の温度感受性コリシン D に対する生菌率

温度感受性コリシン D を作用させた野生株および tmRNA 欠損株 ($\Delta ssrA$ 株) の耐性度を評価した。野生株と比較して、 $\Delta ssrA$ 株では耐性度が大幅に低下した。実験は 3 連で行い、エラーバーは標準誤差を表す。

T 検定により有意性を調べた (***) $P < 0.01$ 。

また、温度感受性コリシン D を各変異株に 30°C で 2 時間作用させた後、42°C でコロニーを形成させて c.f.u.を測定した (Fig. 4-6)。 $\Delta relE$ および $\Delta rtcB$ 株では、温度感受性コリシン D 作用後の c.f.u.が野生株とほぼ同程度であったことか

ら、この静菌的生育停止に RelE と RtcB は関与しないと考えた。一方で $\Delta arfA$ および $\Delta yaeJ$ 株では、温度感受性コリシン D 添加により、程度は低いものの c.f.u. が有意に低下した。このことから、ArfA および YaeJ は部分的に静菌的生育停止に関与することが示唆された。今回調べた破壊株の中で、 $\Delta smpB$ 株において、温度感受性コリシン D に対する耐性が最も顕著に低下していた。このことから、この静菌的生育停止あるいはそれからの回復に SmpB が関与すると考えた。以上の結果から、tRNA 切断に伴う静菌的生育停止を回復可能な状態にするのに対して、tmRNA および SmpB による *trans*-translation が関与することが示された。

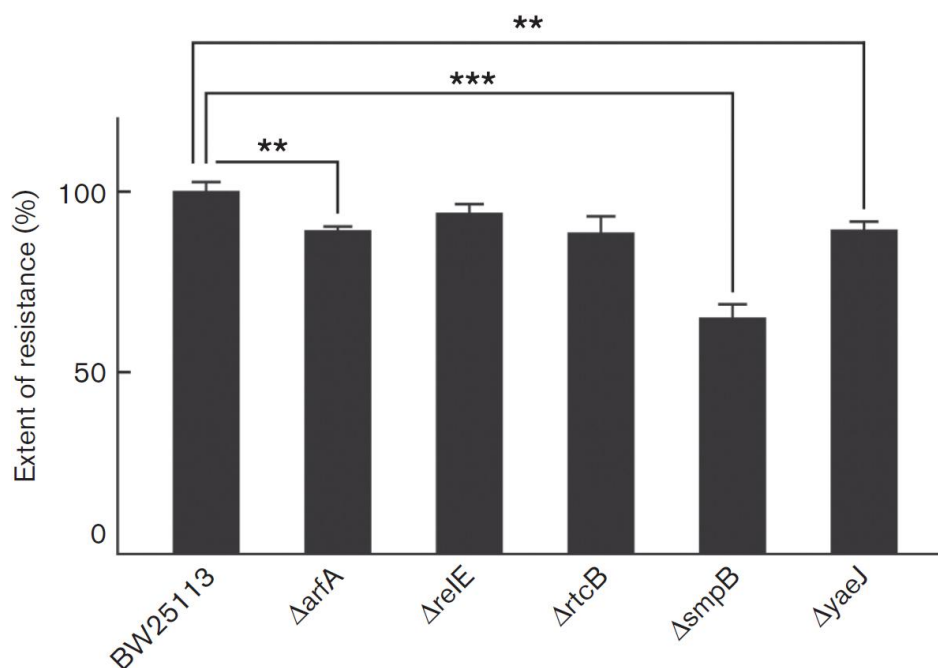


Fig. 4-6 各翻訳関連因子の温度感受性コリシン D に対する耐性度
 親株 (BW25113) および各翻訳関連因子破壊株の、温度感受性コリシン D に対する耐性度を調べた。 $\Delta relE$ および $\Delta rtcB$ 株では、温度感受性コリシン D 作用後の c.f.u. が野生株とほぼ同程度であった。一方で $\Delta arfA$ および $\Delta yaeJ$ 株では、温度感受性コリシン D 添加により、程度は低いものの c.f.u. が有意に低下した。 $\Delta smpB$ 株において温度感受性コリシン D に対する耐性が最も顕著に低下していた。

実験は 3 連で行い、エラーバーは標準誤差を表す。

4-3-3 野生型コリシン D も感受性菌の静菌的生育停止を誘導する

これまでの結果から、tRNA を切断された感受性菌は直ちに細胞死とはならず、少なくとも 2 時間以上、一定の期間は静菌的生育停止になることが示唆された。しかし、この結果は温度感受性コリシン D を用いた時のものである。そこで、野生型コリシン D を用いて、どれくらい生きているのかを別の方法（LIVE/DEAD 染色法）で調べた。野生型コリシン D に加え、別の tRNA 特異的リボヌクレアーゼであるコリシン E5 も同様に実験に用いることで、tRNA 切断性と細胞の静菌的生育停止との関係を更に検証した。ここでは rRNA 切断型であるコリシン E3 を一種のコントロールとして用いた。また、感受性菌に作用させるコリシン D、E5 および E3 の殺菌活性を統一するため、各コリシンを様々な濃度で添加した際の、感受性菌 W3110 の c.f.u. を測定することで活性を比較した（Fig. 4-7。その結果、10 mL の感受性菌培養液に対し、コリシン D、E5、E3 をそれぞれ 80 μ g、176 ng、360 ng 添加すると、同一の殺菌活性（killing activity = 5.2）となることが分かったため、この添加量を採用することとした。

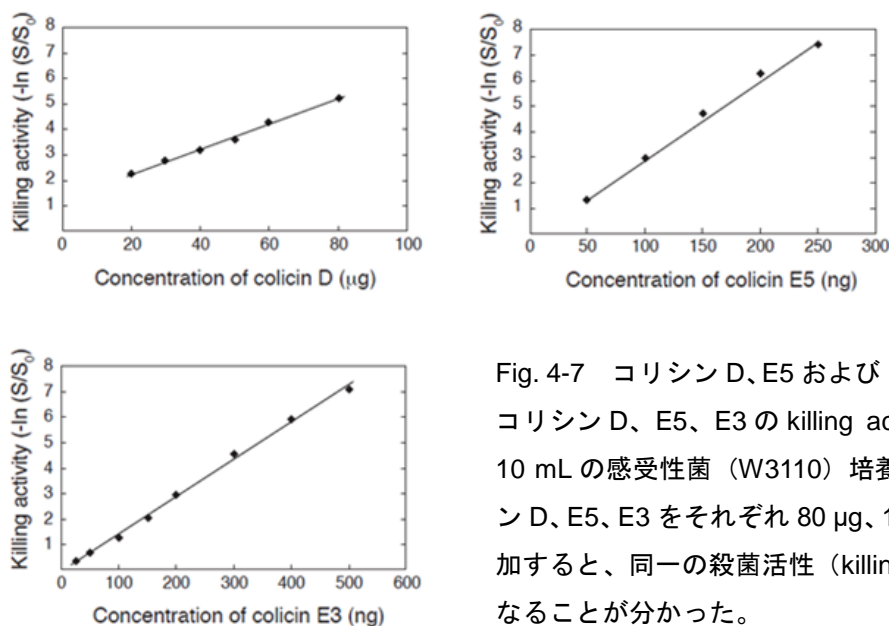


Fig. 4-7 コリシン D、E5 および E3 の killing activity
コリシン D、E5、E3 の killing activity を測定した。
10 mL の感受性菌（W3110）培養液に対し、コリシン D、E5、E3 をそれぞれ 80 μ g、176 ng、360 ng 添加すると、同一の殺菌活性（killing activity = 5.2）となることが分かった。

野生型コリシン D およびコリシン E3 を、上述の通り killing activity = 5.2 となるよう大腸菌培養液に添加した後、LIVE/DEAD 染色法を用いた蛍光顕微鏡観察により経時的に生菌数を追跡した (Fig. 4-8)。

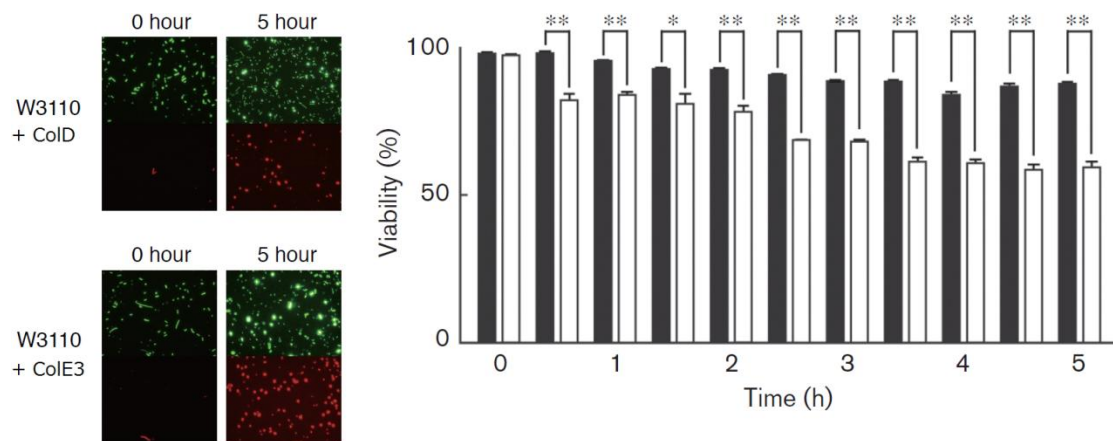


Fig. 4-8 LIVE/DEAD 染色法を用いたコリシン D と E3 に対する感受性菌の生菌率の測定 c.f.u.の測定に替えて、LIVE/DEAD 染色法により、コリシン D、E3 を作用させた時の生菌率の推移を経時的に測定した。左側は、蛍光顕微鏡で観察した結果である。赤色は死細胞（細胞膜に損傷を受けた細胞）であり、緑色は生細胞である。この蛍光顕微鏡観察結果から、生菌率を計算して右図に示した。コリシン D およびコリシン E3 を添加した際の生菌率を、それぞれ黒および白の棒グラフで表す。コリシン D を添加した際には、5 時間が経過した段階でも生菌率は約 90%程度を維持していた。一方で、コリシン E3 を添加すると、30 分間が経過した段階で、すでに生菌率が 80%程度にまで低下し、5 時間の段階ではほぼ半数の菌が死菌と判定された。

実験は 3 連で行い、エラーバーは標準誤差を表す。

T 検定により有意性を調べた (*P<0.1、**P<0.05)

図中、コリシン D、コリシン E3 添加後の LIVE/DEAD でみた生菌率を、それぞれ黒あるいは白い棒グラフで示した。コリシン D を添加した際には、少なくとも 1 時間が経過した段階では、明確な生菌率の低下は観察されなかった。その後、若干の低下はみられるものの、5 時間が経過した段階でも生菌率は 90%程

度を維持していた。一方で、コリシン E3 を添加すると、30 分間が経過した段階で、すでに生菌率が 80%程度にまで低下し、5 時間の段階ではほぼ半数の菌が死菌と判定された。以上の結果から、温度感受性コリシン D を用いた tRNA 切断に誘導される静菌的生育停止が、野生型コリシン D を用いた際にも観察されることが分かった。また、これはコリシン E3 を用いた際には見られなかったことから、tRNA 切断に特異的な現象であることが示唆された。

次に、この静菌的生育停止の誘導が tRNA 切断に特異的であるかを検証するために、もうひとつの tRNA 特異的コリシンであるコリシン E5 を用いて同様の実験を行った。コリシン D、E3 および E5 を、先程と同様に killing activity = 5.2 となるよう大腸菌培養液に添加した後、LIVE/DEAD 染色法により生菌率を測定した (Fig. 4-9)。図中、コリシン D、コリシン E3、コリシン E5 添加後の LIVE/DEAD でみた生菌率を、それぞれ黒、白、灰色の棒グラフで示した。コリシン D およびコリシン E5 を添加した際には、2.5 時間経過時であっても、感受性菌はほぼ 100%の生菌率を維持していたが、一方でコリシン E3 を添加した株では、生菌率は明確に低下していた。また、コリシン D 添加後 5 時間の段階では、感受性菌はまだ高い生菌率を示したが、コリシン E5 を添加した方では、これが 70%程度にまで低下していた。また、コリシン添加後 2.5, 5 時間の両方の時間において、コリシン E3 を添加した際に最も低い生菌率を示していた。このように、この静菌的生育停止は、コリシン D、コリシン E5 のいずれでも観察されたことから、tRNA 切断に特異的に誘導されることが分かった。

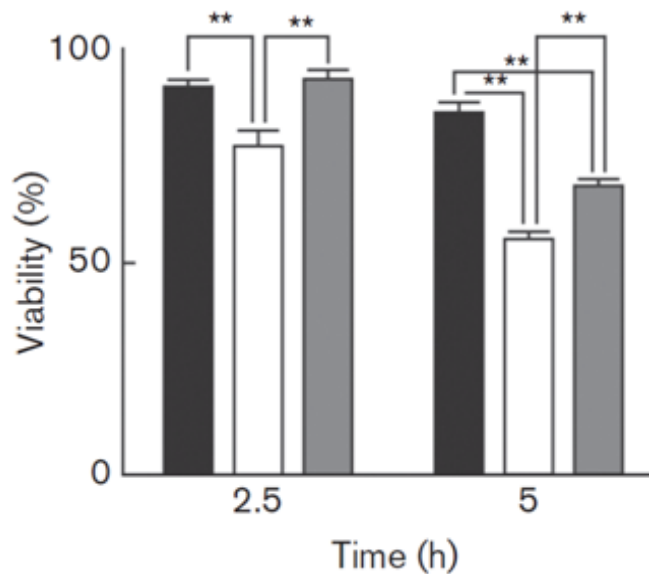


Fig. 4-9 LIVE/DEAD 染色法を用いたコリシン D、E3 および E5 に対する感受性菌の生菌率の測定

Fig. 4-8 と同様の方法で、コリシン D、E3、E5 に対する生菌数の変化を経時的に調べた。コリシン D、E3、E5 に対する生菌率は、それぞれ黒、灰色、白の棒グラフで表した。コリシン D とコリシン E5 を添加した際には、2.5 時間が経過しても、感受性菌はほぼ 100% の生菌率を維持していたが、一方でコリシン E3 (白いバー) を添加した株では、生菌率は明確に低下した。また、コリシン D 添加後 5 時間の段階では、感受性菌はまだ高い生菌率を示したが、コリシン E5 を添加した方では、これが 70% 程度にまで低下した。コリシン E3 添加では生菌率は 50% 程度になった。

実験は 3 連で行い、エラーバーは標準誤差を表す。

T 検定により有意性を調べた (**P<0.05)

4-3-4 野生型コリシン D に誘導される静菌的生育停止にも *trans*-translation が関与する

(Fig. 4-5) および (Fig. 4-6) の結果より、SmpB と tmRNA を介した *trans*-translation が、tRNA 切断に誘導される静菌的生育停止の維持に関わることが分かった。これを踏まえると、tmRNA を欠損した Δ ssrA 株では、コリシン

D を添加しても静菌的生育停止は観察されないことが考えられた。そこで、これを調べるために、野生株および $\Delta ssrA$ 株にコリシン D を作用させた後、LIVE/DEAD 染色法によりそれぞれの生菌率を経時的に測定した (Fig. 4-10)。

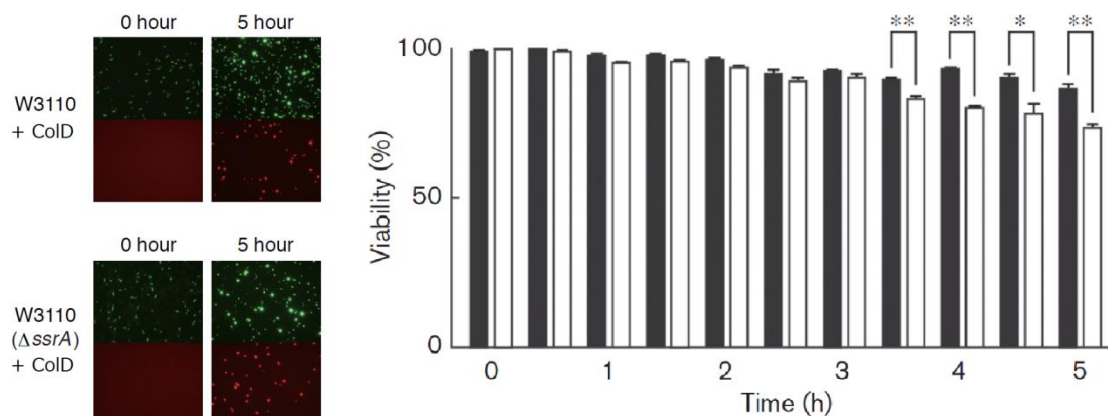


Fig. 4-10 LIVE/DEAD 染色法を用いたコリシン D に対する野生型および tmRNA 欠損大腸菌株の生菌率の測定

Fig. 4-8 と同様の方法で、コリシン D に対する野生株および tmRNA 欠損株の生菌率の変化を経時的に測定した。野生株および $\Delta ssrA$ 株の生菌率を、それぞれ黒および白の棒グラフで表した。コリシン D を添加した後、野生株、 $\Delta ssrA$ 株共に、3 時間までは高い生菌率を維持した。3 時間が経過した段階で、野生型は依然として 90% 程度の生菌率であったが、 $\Delta ssrA$ 株では生菌率が有意に低下した。

実験は 3 連で行い、エラーバーは標準誤差を表す。

T 検定により有意性を調べた (* $P < 0.1$ 、** $P < 0.05$)

野生株および $\Delta ssrA$ 株の LIVE/DEAD でみた生菌率を、それぞれ黒あるいは白の棒グラフで示した。コリシン D を添加した後、3 時間の段階までは、 $\Delta ssrA$ 株は野生型と共にほぼ 100% に近い生菌率を維持していた。しかし、これ以降、野生株は依然として 90% 以上の生菌率を維持することに比べ、 $\Delta ssrA$ 株では生菌率が有意に低下していった。すなわち、温度感受性コリシン D を用いることで

分かった *trans*-translation と静菌的生育停止との関係が、野生型コリシン D を用いても再現されることが示された。

静菌的生育停止と tmRNA の関連性を更に検証するため、*ssrA* 遺伝子の相補実験を行った。ここでは、 $\Delta ssrA$ 株に対してコントロールである pMW118 および pMW*ssrA*, pMW*ssrA*-DD を導入した株を用いた。pMW*ssrA* は、低コピープラスミドである pMW118 から天然のプロモーターに依存して tmRNA が発現する。また、pMW*ssrA*-DD からは、変異型 tmRNA が発現する。この変異型 tmRNA は、C 末端に余分に Asp-Asp (DD) 配列を付加することで、分解シグナルとしての機能を失ったペプチド配列をコードしている[Nakano H et al., 2001]。以降、これらの株を $\Delta ssrA$ [pMW118]、 $\Delta ssrA$ [pMW*ssrA*]、 $\Delta ssrA$ [pMW*ssrA*-DD] 株と呼ぶ。野生型コリシン D を $\Delta ssrA$ [pMW118]株、 $\Delta ssrA$ [pMW*ssrA*]株および $\Delta ssrA$ [pMW*ssrA*-DD]株培養液に添加し、5 時間後の生菌率を調べた (Fig. 4-11)。 $\Delta ssrA$ [pMW118]株、 $\Delta ssrA$ [pMW*ssrA*]株および $\Delta ssrA$ [pMW*ssrA*-DD]株の LIVE/DEAD でみた生菌率は、それぞれ白、黒、灰色の棒グラフで示した。 $\Delta ssrA$ [pMW*ssrA*]株および $\Delta ssrA$ [pMW*ssrA*-DD]株は、 $\Delta ssrA$ [pMW118]株より高い生存率を示した。また、 $\Delta ssrA$ [pMW*ssrA*]株の生菌率は、 $\Delta ssrA$ [pMW*ssrA*-DD]株のものより高かった。このことから、静菌的生育停止に *trans*-translation が関わることを、野生型コリシン D を用いても再現出来た。また、tmRNA による分解タグの付加も、これに関わることが示された。

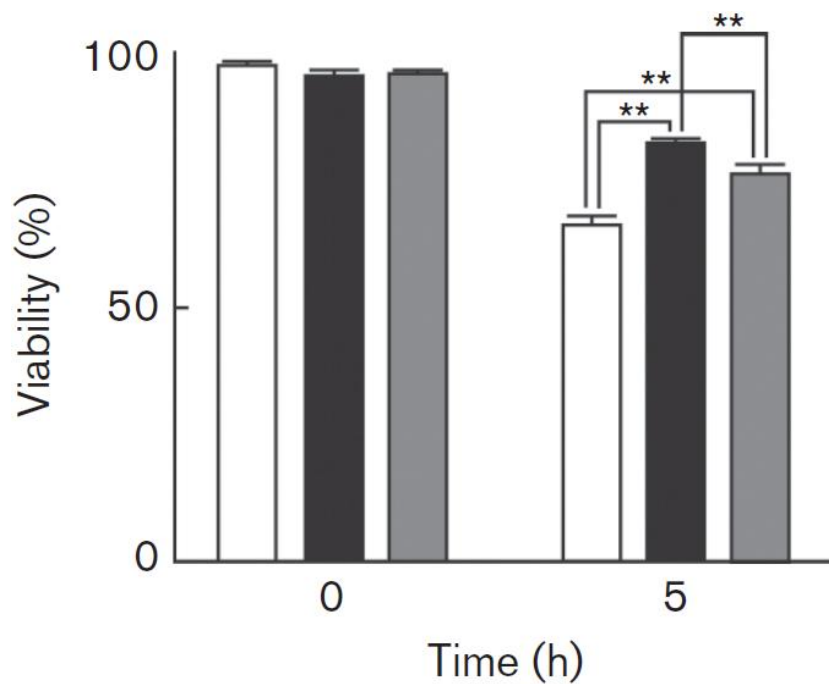


Fig. 4-11 LIVE/DEAD 染色法を用いたコリシン D に対する野生株および各 tmRNA 発現株の生菌率の測定

Fig. 4-8 と同様の方法で、コリシン D に対する $\Delta ssrA$ [pMW118] (白色)、 $\Delta ssrA$ [pMWssrA] (黒色)、 $\Delta ssrA$ [pMWssrA-DD] 株 (灰色) の生菌率を測定した。コリシン D 添加後 5 時間の段階では、 $\Delta ssrA$ [pMWssrA] 株と $\Delta ssrA$ [pMWssrA-DD] 株は共にコントロール株 ($\Delta ssrA$ [pMW118] 株) より高い生存率を示した。また、 $\Delta ssrA$ [pMWssrA] 株の生菌率は、 $\Delta ssrA$ [pMWssrA-DD] 株のものより高かった。

実験は 3 連で行い、エラーバーは標準誤差を表す。

T 検定により有意性を調べた (**P<0.05)

4-4 考察

4-4-1 tRNA 切断に誘導される静菌的生育停止に *trans*-translation が関与する

本章の結果より、tRNA が切断されても、大腸菌は直ちに細胞死には至らず、一定時間は静菌的生育停止状態を維持することが分かった。c.f.u.の低下が見られることから、一定時間を過ぎると、最終的には死菌となると考えられる。あるいは、VBNC のような、コロニー形成出来ない状態へと移行する可能性もある。本章で用いた温度感受性コリシン D (Y609N)は、活性中心残基と考えられる Lys608 および His611 の近傍に位置する Tyr609 が Asn へと変換したものであり、またこれらは同一の α ヘリックスの上存在する (Fig. 4-12)。

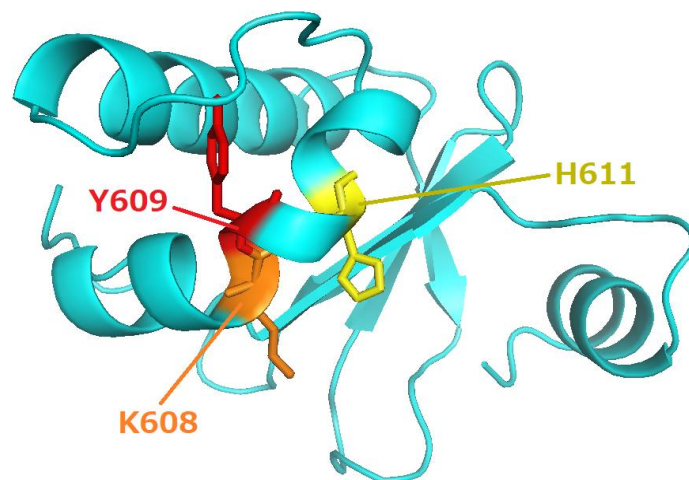


Fig. 4-12 コリシン D595 の立体構造における K608, Y609, H611 の位置
ColD595/ImmD (PDB ID: 1TFO) より取り出した D-CRD595 の立体構造 (水色) における K608 (オレンジ)、Y609 (赤) および H611 (黄色) の位置を示した。コリシン D を温度感受性にする Y609 は、これらのアミノ酸残基は一本の α ヘリックスの上にある。

このアミノ酸置換により、活性中心構造は高温において安定した構造が取

れなくなると思われ、結果的に非許容温度下（42°C）では活性を失うと考えられる。（Fig. 4-5）および（Fig. 4-6）の結果より、 $\Delta ssrA$ 株と $\Delta smpB$ 株では、温度感受性コリシンDによる tRNA 切断により生存率が低下したことから、tmRNA と SmpB、すなわちこれらが担う *trans*-translation が静菌的生育停止あるいはそれからの回復に重要だと示唆された。

細胞にとって最も有害なのは、tRNA の切断により多数のリボソームが mRNA 上で停滞することと考えられた。これに対し、大腸菌を含めた真正細菌、および一部の葉緑体やミトコンドリアでは、tmRNA（10Sa RNA, SsrA と呼ばれる）と呼ばれる、低分子 RNA を介したリボソームのリサイクリングが行われ、mRNA からリボソームが解離される。この tmRNA は、低分子のタンパク質因子である Small Protein B（SmpB）と複合体を形成し、機能が停止状態になったリボソームの A 部位に入る。伸長中のペプチドにアラニンを付加したあとに P 部位に移動し、自身のアンチコドン部位にある配列をリボソームに読ませる。これにより、伸長ペプチドの C 末端に分解タグを付加した後、ペプチド合成を終了させることで、mRNA の 3' 末端において停滞したリボソームをレスキューする *trans*-translation を行う [Keiler KC, 2008][Shimizu Y 2012] [Karzai AW et al., 1999] [Handa Y et al., 2011]。ArfA および YaeJ は、リボソームの再利用因子として知られている。RelE は、大腸菌を含めた原核生物に広く存在する TA システムであり、リボヌクレアーゼ活性を示す「トキシン」である。そして、この活性を中和する「アンチトキシン」である RelB と共に機能する。RelE はストレス条件下で、翻訳停止した mRNA 上のリボソームの A 部位に侵入し、A 部位

に位置する mRNA コドンの特異的に切断する活性を持つ [Pedersen K et al., 2003]。RtcB は、コリシン E5 や D などの切断により生じた 2' , 3' 環状リン酸基と 5' 水酸基を連結する RNA リガーゼである [Tanaka N, Shuman S, 2011]。

mRNA 上で異常停止したリボソームは、tmRNA を介した *trans*-translation によってそれぞれのサブユニットへと解離されることで mRNA から離れリサイクルされる。tmRNA および SmpB は、ゲノムが解読されたほぼ全ての真正細菌に存在することから、普遍性の高い機構であると考えられている [Keiler KC, 2015]。tmRNA は、tRNA および mRNA を擬態したドメイン構造を持つ低分子 RNA である。tmRNA の 3' 末端にはアラニル tRNA 合成酵素によりアラニンが付加される。SmpB は、この tRNA 様ドメインに結合し、tRNA のアンチコドンステムループを擬態する。tmRNA-SmpB の複合体結晶構造を (Fig. 4-13) に示した。まず、tmRNA は SmpB (青色) と複合体を形成し、tRNA 様ドメイン (赤色) が、停止したリボソームの A 部位に入る。次に、tRNA 様ドメインと SmpB との複合体構造が、EF-Tu 依存的にリボソームの P 部位に移動する。これにより、翻訳のフレームは mRNA から tmRNA 上の mRNA 様ドメイン (ピンク色) へと切り替わる。tmRNA の mRNA 様ドメインはプロテアーゼの標的となる分解シグナルをコードしており、伸長停止した不完全なペプチドの分解を促進する。 Δ *ssrA* 株と Δ *smpB* 株では、この *trans*-translation 反応が正常に機能しないため、tRNA が切断されると、おそらくはその tRNA が対合するべき mRNA の位置でリボソームが停止したままレスキューされない。そのため、必要となるタンパク合成が行えないことから、静菌的生育停止が阻害されると考えられる。また、

伸長停止に伴う合成の不完全なペプチドそのものが細胞に有害となり、細胞死をもたらす可能性もある。

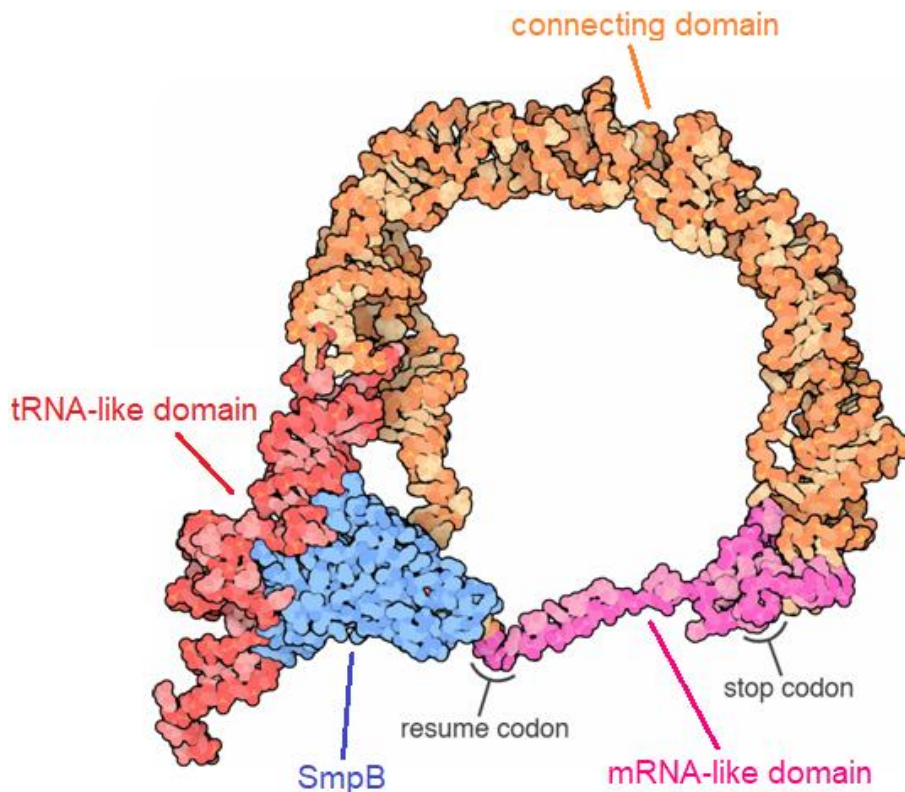


Fig. 4-13 tmRNA-SmpB の複合体結晶構造 (PDB ID: 3IYR)

Félix らにより報告された tmRNA-SmpB の複合体結晶構造を示した。tmRNA は SmpB (青色) と複合体を形成し、tRNA 様ドメイン (赤色) が停止したリボソームの A 部位に入る。その後、翻訳は、mRNA から分解シグナルをコードした mRNA 様ドメイン (ピンク色) へと切り替わることで、伸長停止したペプチド鎖にこれを付加する。オレンジ色は connecting ドメインである。

[Weis F et al., 2010]、PDBj のサイトから転載

Garza-Sánchez らにより、アミノ酸飢餓状態にある大腸菌において、リボソームの A サイトに位置するコドンで mRNA が切断されることが報告された [Garza-Sánchez F et al., 2008]。当初、この切断は停止コドン特異的と考えられ

ていたが、Garza-Sánchez らは、これがセンスコドンでも起こることを示した。すなわち、レアコドン連続させることで、人為的にリボソームの停止を誘導したところ、このレアコドン上で mRNA が切断された。更に、同グループは、コリシン D を用いてリボソームを停止させた際にも、アルギニンコドン上で mRNA の切断が起こることを証明した。このアルギニンコドンの切断は Δ ssrA 株でのみ観察され、野生株では起こらなかった。これに関して、Garza-Sánchez らは、切断された tRNA^{Arg} と tmRNA とがリボソームの A サイト上で競合していると考えた。

4-4-2 ArfA は部分的に静菌的生育停止に関与する

細胞内では、様々な理由で翻訳伸長反応が異常停止することがあり、すでに述べた通りこれには tmRNA、SmpB を介した *trans*-translation が関与する。そして、この *trans*-translation に対するバックアップシステムが存在することも知られている。大腸菌では、ArfA (alternative ribosome-rescue factor A、別名 YhdL)、および ArfB (alternative ribosome-rescue factor B、別名 YaeJ) が、*trans*-translation の代替として機能することが報告されている。 Δ arfA 変異株は通常は何の表現型も示さないが、tmRNA もしくは smpB の欠損との組み合わせで合成致死となる。すなわち、ArfA は、*trans*-translation が機能しない大腸菌の生育には必須であると考えられる[Abo T, Chadani Y., 2015]。Chengying-Ma らは、70S リボソーム、ArfA、翻訳終結因子 RF2、開始 tRNA、および mRNA からなるノンストップ複合体をクライオ電子顕微鏡により解析し、3.0 Å の分解能

で構造を決定した (Fig. 4-14) [Ma C et al., 2017]。ArfA (赤色) の N 末端領域は、リボソーム 30S サブユニット (黄色) の decoding 領域および RF2 (緑色) と結合する。一方、ArfA の C 末端領域は、リボソームの mRNA 結合部位に位置することが明らかにされた。これより、ArfA は、mRNA の 3' 末端の側において停滞するリボソームをレスキューすることが示唆された。

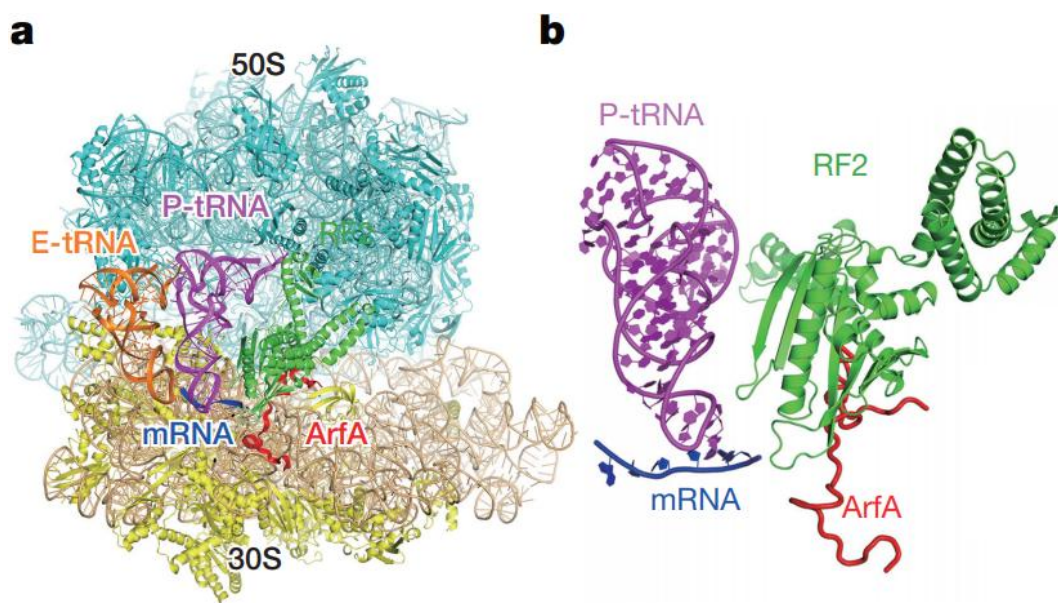


Fig. 4-14 Non-stop リボソームと ArfA と RF2 の複合体結晶構造

Chengying-Ma らにより報告された 70S リボソーム、ArfA、RF2、開始 tRNA、および mRNA からなるノンストップの複合体結晶構造を示した。(a) 複合体結晶構造の全体図。(b) ArfA の構造を中心とした拡大図。ArfA は赤色、RF2 は緑色、P-site にある tRNA^{f-Met} は紫色、E-site にある tRNA はオレンジ色、non-stop mRNA は青色で示した。ArfA の N 末端領域は、RF2 と結合する。

[Ma C et al., 2017]から転載

(Fig. 4-6) の結果によると、 $\Delta arfA$ と $\Delta yaeJ$ 株に温度感受性コリシン D を作用させると、 $\Delta smpB$ 株に比べると程度は低いものの c.f.u. が有意に低下した。*arfA* は、通常は non-stop mRNA として発現するため、*trans-translation* の標的

となって分解されるため、細胞内にはほとんど存在しない。しかし、特定の要因で細胞内の non-stop mRNA 量が増加し、*trans*-translation システムの処理能力を超えたとき、バックアップ機構として ArfA が機能する[Abo T, Chadani Y., 2015]。温度感受性コリシン D による tRNA^{Arg} の切断により、mRNA に停滞するリボソームが蓄積するであろう。*trans*-translation 反応によってリボソームがレスキューされるであろうが、このリボソームの蓄積速度が、このレスキューの速度を上回った際に、ArfA が機能する可能性がある。 $\Delta arfA$ 株で若干ながらも生菌率が低下したのは、このバックアップ機構が損なわれたためと考えられる。以上のことから、ArfA は静菌的生育停止に部分的に関与することが示唆されたが、断定するには更なる実験が必要と考えられる。

4-4-3 tRNA が切断された細胞は静菌的生育停止になる

同様に tRNA を切断する活性を持つにもかかわらず、コリシン D と E5 とでは、感受性菌が静菌的生育停止を維持する時間に違いが見られた (Fig. 4-9)。これは、標的となる tRNA の種類の相違に基づくものと考えられる。Kristoffer らの研究により、*Shigella flexneri* と *Salmonella enterica* から生産した VapC は、異所発現させた大腸菌の tRNA^{fMet} アンチコドンループの 3' 末端側を切断し、細胞を静菌的生育停止の状態に導くことが分かった[Winther KS., Gerdes K., 2011]。tRNA^{fMet} は翻訳開始に関わるものであり、コリシン D と E5 のターゲットになる elongator tRNA と異なるが、本章の結果によると、そうした違いにもかかわらず、tRNA が切断された大腸菌は、静菌的に生育を停止することが分

かった。大腸菌の *prr* locus にコードされる PrrC は、宿主細胞の tRNA^{Lys} を特異的に切断する活性を持つ [Kaufmann G. 2000]。通常は、PrrC は制限修飾系である *Ecoprri* と結合することで不活化している。そして、宿主大腸菌が T4 phage に感染すると PrrC が活化され、細胞内 tRNA^{Lys} のアンチコドンループを切断する。これは、感染細胞が「自殺」することで、同属の細菌集団をファージの更なる感染から守ると考えられていた。しかし、上述の通り、tRNA の切断が直ちに細胞死を誘導しないことを踏まえると、別の解釈が可能となる。すなわち、tRNA^{Lys} が切断された細胞は、一時的に静菌的生育停止状態になり、これによりファージ感染の収束を待つというものである。この場合、再度生育を開始する必要がある。PrrC は非常に不安定であることが分かっており、こうした性質が、生育再開を可能としているかもしれない。すなわち、これは集団ではなく個々の細胞に対する防衛手段とも考えられる。

以上のことから、tRNA の切断そのものは、必ずしも細胞を殺すことが目的ではなく、一義的には自身、あるいは他細胞の生育制御に利用されている可能性がある。コリシン D や E5 の生産菌集団は、他の大腸菌集団の生育を抑制しつつ、自らは集団の細胞数を増やし、優位性を確保している可能性がある。

総合考察

コリシンは、大腸菌やその近縁種が環境の変化に応答する SOS 機能によって誘導合成される細胞毒性を持ったタンパク質である。このように、微生物は、毒素を生産して他の細胞を殺すことで、生態的優位性を獲得している。自然界では、約三分の一の大腸菌がコリシンを作っており、コリシンには普遍的な意味があると考えられる。しかし、抗生物質や一般の生物毒とは違い、生産菌と同種、或いは極めて近縁の細菌しか殺さないで、他の種の生物に対するニッチ獲得の手段としては機能していない。このことから、コリシンは一種の TA システムとしてプラスミドが獲得した利己的な因子だと考えられる。コリシンの作用スペクトルは狭く、感受性菌の特定の細胞表層レセプターに吸着する必要があるが、細菌はコリシンを受け入れるための、「専用」のレセプターを持つはずがない。コリシンはファージと同様で、感受性菌の生育に必要な物質を取り込むためのレセプターを悪用している。

古くから生化学的な研究が行われており、様々なタイプのコリシンが報告されている。生産菌から放出されたコリシンは、まずは感受性菌の外膜にあるレセプターと結合し、数段階の過程を経過して細胞内に侵入し、C 末端にある毒素ドメインが様々な細胞内標的を攻撃する。コリシンは、この侵入過程に応じてそれぞれ対応するドメインを持っており、レセプターとの結合と膜侵入経路は、ある程度似ているが、細胞毒性の種類は様々なので、最終的なコリシンの種類は非常に多いものとなる。

本研究の第 1 章では、コリシン D 全長の立体構造の決定を試みたが、コリシン D のドメイン配置がコンパクトではなく、結晶を観察できなかった。第 2 章では、コリシン D の CD-CRD の結晶構造を決定し、これを用いて全長コリシン D の立体構造モデルを構築した。特に、CD の立体構造を初めて決定したことにより、内膜透過に関わる因子と相互作用する領域の構造的特徴を明らかにした。また、全長コリシン D の構造を用いて、感受性菌への透過経路を推定した。コリシン D はヌクレアーゼ型コリシンのため、活性ドメインである CRD 以外の領域は、感受性菌の外膜と内膜の透過に関与することがすでに予想されていた。しかし、本研究で立体構造が新しく分かったドメインである CD の配列を用いて検索してみたところ、他の既知タンパク質の配列の中で 30%以上の配列同一性が見られるものがまったく存在していない。すなわち、CD の結晶構造を解明したことには、コリシンと他のコリシン様バクテリオシンの構造生物学的な作用機構の解明に、重なる知見がある。コリシン D の CD の core fold は、グループ A やグループ B コリシンの N 末端に存在する translocation ドメインと似ていることが本研究によって分かった。これらのドメインは共通のタンパク質を祖先に持ち、細菌の外膜及び内膜に存在する様々なタンパク質を乗っ取ることで膜透過機能を持つように分子進化してきたと予想される。

Mora らの結果によると、全長のコリシン D は水溶液中で 2 量体構造になっていることが示されている[Mora L et al., 2015]。しかし、感受性菌の細胞に侵入する際には、モノマーになっていると考えられる。コリシン D は、感受性菌の TonB システムの作用で periplasm に引き込まれる。TonB システムは、内膜に位

置するエネルギー変換を担う Ton 複合体 (ExbB-ExbD-TonB) と、外膜にある TonB-dependent transporter で構成されている。TonB-dependent transporter にリガンドが結合すると、Ton 複合体は構造変化が引き起こされ、内膜で生成される PMF をエネルギー源として外部の栄養素を取り込む。水溶液中で 2 量体構造になっているコリシン D は、このエネルギーを利用してモノマー構造になる可能性が考えられる。ImmD も、外膜に伝達された PMF を利用することで、コリシン D の CRD から解離すると考えられているが、実験的にはまだ証明されていない。また、全長コリシン D の結晶構造が決定されていないため、今後の展望としては、クライオ電子顕微鏡法 (Cryo-electron microscopy) を用いれば、高分解能の全長コリシン D および LBS の立体構造が得られると期待される。クライオ電子顕微鏡法は透過型電子顕微鏡法の一つで、試料を低温において解析する手法である。試料を染色せず、凍結することで固定して試料を観察するため、今までの電子顕微鏡法と比べると、より生体内に近い試料の構造を観察出来ると考えられる。また、FtsH による内膜通過の詳しい機構については不明な部分が多いため、今後の課題として、コリシン D の CD と LepB の複合体結晶構造の決定、及び 2017 年に White らが発表した論文で用いた実験方法 (UV-inducible cross-linker *para*-Benzoylphenylalanine、[White P et al., 2017]) を模倣して、CRD が FtsH を通過する機構に関する実験が必要ではないかと考えられる。

第 3 章では、CRD と tRNA^{Arg} の複合体結晶構造の解明を試みた。本研究の以前に、高橋一敏と寺本和矢の実験により、コリシン D の最小活性ドメインで

ある ColD595 を用いて、基質 tRNA^{Arg}_{ACG} および基質アナログ tRNA^{Arg}_{ACGdA} との共結晶化を試みられたが、結晶が得られなかった。本研究では、結晶性を向上させるために、tRNA を部分的に改変するのは困難であったため、コリシン D の構造を改変することに工夫を試みた。結晶内の分子がパッキングしやすくなるよう、N 末端の長さを変化させた様々なコリシン D を用いた。様々なコンストラクトと結晶条件の組み合わせを試みたが、CRD の tRNA 切断活性が非常に高く、tRNA と安定した複合体構造を維持できないことが考えられた。tRNA が正常に機能するためには、転写されたのち、様々な修飾される必要がある。tRNA にはこれまで 100 を超える修飾が知られており、37 位の G におけるメチル化修飾はタンパク質の生合成において正確性を保つため、非常に重要である。tRNA の 37 位は mRNA と結合するアンチコドン領域のすぐ隣に位置し、そのメチル化修飾は多くの機能を果たす。そして、もっとも重要な役割は、リボソームにおいて tRNA が mRNA と結合する際にフレームシフトを防止することである。本章で用いた tRNA^{Arg}_{ACG} 転写産物は、メチル化修飾がされていないことによって外れやすくなり、コリシン D と共結晶化が出来なかった可能性が考えられる。今後の展望として、直接に細胞から tRNA を精製し、メチル化修飾された tRNA^{Arg}_{ACG} を獲得することで、コリシン D との共結晶化が成功出来る可能性が考えられる。ただし、コリシン D は基質 tRNA を分解し、更に高濃度においては非特異的に分解するので、基質 tRNA の切断を防ぐことを更に工夫する必要があると考えられる。

CRD が細胞内の tRNA^{Arg} を特異的に認識・切断する機構の構造基盤の解明

には至らなかったが、第4章では、CRDの活性により引き起こされるタンパク質合成の阻害が感受性菌に与える影響の一端を明らかにすることができた。すなわち、tRNAを切断された大腸菌は直ちに細胞死には至らず、一定時間は *trans-translation* に依存して静菌的に生育を停止することが分かった。tRNA切断によりコロニー形成能が低下することから、最終的には死菌となると考えられる。あるいは、生きてはいるがコロニーを形成出来ない状態へと移行する可能性もある。

コリシンDとコリシンE5では、立体構造は異なっており、これらtRNAを切断するRNase活性の間では、構造の共通性がないのではないかと考えられる。以上の事実を踏まえると、これらRNaseは収斂進化の産物である可能性が考えられる。コリシンDのようなtRNAを切断するRNase活性を持つタンパク質は、高い特異性を持つため、単に細胞の増殖を停止する目的のためではないだろうかと思われる。tRNAは細胞内の制御因子として関わっているため、逆にtRNAの量を調整する機構が存在する必要性も考えられる。そのため、このtRNAの量を管理するものがtRNAを切断する活性を持つタンパク質なのではないだろうかと考えられる。そして、進化の過程において、これらのタンパク質がコリシンの様なバクテリオシンに進化し、攻撃手段の一種として利用されるのではないだろうか。今後の研究が進むと共に、新たなRNaseの発見により、これらの疑問が解決されることが期待される。

本研究により明らかにした、コリシンDの感受性大腸菌への侵入経路およびCRDの高い基質特異性に関する知見は、他のコリシン様バクテリオシンの作用

機構解明にも貢献できると考えられる。例えば*Pseudomonas aeruginosa*由来の pyocins、*Yersinia pestis*由来のpesticins、*Klebsiella pneumoniae*由来のklebicins、*Enterobacter cloacae*由来のcloacins、*Photobacterium luminescens*由来のlumicinsがある。更に、大腸菌感染症に対する治療など、臨床方面への応用も期待される。

References

Abo T, Chadani Y. (2015) Ribosome rescue systems in *Escherichia coli*. *Seikagaku* **6**, 736 - 740.

Akiyama, Y., Yoshihisa, T., Ito, K. (1995) FtsH, a membrane-bound ATPase, forms a complex in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **270(40)**, 23485 - 23490

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. & Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**, 0008.

Bachmann, B.J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev.* **36**, 525 - 557

Ball, S.A., Nich, C., Rounsaville, B.J., Eagan, D., and Carroll, K.M. (2004) Millon Clinical Multiaxial Inventory-III subtypes of opioid dependence: validity and matching to behavioral therapies. *J Consult Clin Psychol.* **72**, 698 - 711

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., and Schwede, T. (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **42**, W252 - 258

Bowman, C.M., Dahlberg, J.E., Ikemura, T., Konisky, J., Nomura, M. (1971) Specific inactivation of 16S ribosomal RNA induced by colicin E3 *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **68**, 964 - 968

Braun, V., Patzer, S.I., and Hantke, K. (2002) Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie.* **84**, 365 - 380

Buchanan, S.K., Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., and Deisenhofer, J. (1999) Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from Escherichia coli. *Nat Struct Biol.* **6**, 56 - 63

Cascales, E., Buchanan, S.K., Duche, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007) Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* **71**, 158 - 229

Celia, H., Noinaj, N., Zakharov, S.D., Bordignon, E., Botos, I., Santamaria, M., Barnard, T.J., Cramer, W.A., Lloubes, R., and Buchanan, S.K. (2016) Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. *Nature.* **538**, 60 - 65

Chang, J.W., Sato, Y., Ogawa, T., Arakawa, T., Fukai, S., Fushinobu, S., Masaki, H. (2018) Crystal structure of the central and the C-terminal RNase domains of colicin D implicated its translocation pathway through inner membrane of target cell. *J Biochem.* doi: 10.1093/jb/mvy056. [Epub ahead of print]

Chauleau, M., Mora, L., Serba, J., and de Zamaroczy, M. (2011) FtsH-dependent processing of RNase colicins D and E3 means that only the cytotoxic domains are imported into the cytoplasm. *J Biol Chem.* **286**, 29397 - 29407

Chavan, M., Rafi, H., Wertz, J., Goldstone, C., and Riley, M.A. (2005) Phage associated bacteriocins reveal a novel mechanism for bacteriocin diversification in *Klebsiella*. *J Mol Evol.* **60**, 546 - 556

Davies, J.K., and Reeves, P. (1975^a) Genetics of resistance to colicins in Escherichia coli K-12: cross-resistance among colicins of group A. *J Bacteriol.* **123**, 102 - 117

Davies, J.K., and Reeves, P. (1975^b) Genetics of resistance to colicins in Escherichia coli K-12: cross-resistance among colicins of group B. *J Bacteriol.* **123**, 96 - 101

Devanathan, S., and Postle, K. (2007) Studies on colicin B translocation: FepA is gated by TonB. *Mol Microbiol.* **65**, 441 - 453

de Zamaroczy, M., Buckingham, R.H. (2002) Importation of nuclease colicins into E coli cells: endoproteolytic cleavage and its prevention by the immunity protein. *Biochimie.* **84**, 423 - 432

de Zamaroczy, M., Mora, L., Lecuyer, A., Geli, V., and Buckingham, R.H. (2001) Cleavage of colicin D is necessary for cell killing and requires the inner membrane peptidase LepB. *Mol Cell.* **8**, 159 - 168

de Zamaroczy, M., Mora, L. (2012) Hijacking cellular functions for processing and delivery of colicins E3 and D into the cytoplasm. *Biochem Soc Trans.* **40**, 1486 - 1491

Ebina, Y., Kishi, F., Miki, T., Kagamiyama, H., Nakazawa, T., Nakazawa, A. (1981) The nucleotide sequence surrounding the promoter region of colicin E1 gene. *Gene.* **15**, 119 - 126

Ebina, Y., Nakazawa, A. (1983) Cyclic AMP-dependent initiation and rho-dependent termination of colicin E1 gene transcription. *J Biol Chem.* **258**, 7072 - 7078

Erzberger, JP., Berger, JM. (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 93 - 114.

Garza- Sánchez, F., Gin, J.G., Hayes, C.S. (2008) Amino acid starvation and colicin D treatment induce A-site mRNA cleavage in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **378**, 505 - 519.

Graille, M., Mora, L., Buckingham, R.H., van Tilbeurgh, H., and de Zamaroczy, M. (2004) Structural inhibition of the colicin D tRNase by the tRNA-mimicking immunity protein. *EMBO J.* **23**, 1474 - 1482

Guisbert, E., Yura, T., Rhodius, V.A., and Gross, C.A. (2008) Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 545 - 554

Handa, Y., Inaho, N., Nameki, N., (2011) YaeJ is a novel ribosome-associated protein in *Escherichia coli* that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1739 - 1748

Hata, T., Hoshi, T., Kanamori, K., Matsumae, A., Sano, Y., Shima, T., Sugawara, R. (1956) Mitomycin, a new antibiotic from *Streptomyces*. I. *J Antibiot (Tokyo)*. **4**, 141 - 146

Hilsenbeck, J.L., Park, H., Chen, G., Youn, B., Postle, K., and Kang, C. (2004) Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Mol Microbiol.* **51**, 711 - 720

Holm, L., and Rosenstrom, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* **38**, W545 - 549

Ito, K., and Akiyama, Y. (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol.* **59**, 211 - 231

Karzai, A.W., Susskind, M.M., Sauer, R.T. (1999) SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J.* **18**, 3793 - 3799

Kaufmann, G. (2000) Anticodon nucleases. *Trends Biochem Sci* **25**, 70 - 74.

Keiler, KC. (2008) Biology of *trans*-translation. *Annu Rev Microbiol.* **62**, 133 - 151

Keiler, K.C. (2015) Mechanisms of ribosome rescue in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **13**, 285 - 297.

Kim, Y.C., Tarr, A.W., and Penfold, C.N. (2014) Colicin import into *E. coli* cells: a model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochim Biophys Acta.* **1843**, 1717 - 1731

Kleanthous, C., Hemmings, A.M., Moore, G.R., and James, R. (1998) Immunity proteins and their specificity for endonuclease colicins: telling right from wrong in protein-protein recognition. *Mol Microbiol.* **28**, 227 - 233

Klenotic, P.A., Carlos, J.L., Samuelson, J.C., Schuenemann, T.A., Tschantz, W.R., Paetzel, M., Strynadka, N.C., and Dalbey, R.E. (2000) The role of the conserved box E residues in the active site of the *Escherichia coli* type I signal peptidase. *J Biol Chem.* **275**, 6490 - 6498

Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. & Inokuchi, H. A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9223 - 9227.

Kunau, W.H., Beyer, A., Franken, T., Götte, K., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, A., Wiebel, FF. (1993) Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics. *Biochimie.* **75(3-4)**, 209 - 224

Kurusu, G., Zakharov, S.D., Zhalnina, M.V., Bano, S., Eroukova, V.Y., Rokitskaya, T.I., Antonenko, Y.N., Wiener, M.C., and Cramer, W.A. (2003) The structure of BtuB with bound colicin E3 R-domain implies a translocon. *Nat Struct Biol.* **10**, 948 - 954

Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., and Lopez, R. (2015) The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* **43**, W580 - 584

Ma, C., Kurita, D., Li, N., Chen, Y., Himeno, H., Gao, N. (2017) Mechanistic insights into the alternative translation termination by ArfA and RF2. *Nature* **541(7638)**, 550 - 553.

Makino, S., Qu, J.N., Uemori, K., Ichikawa, H., Ogura, T., and Matsuzawa, H. (1997) A silent mutation in the *ftsH* gene of *Escherichia coli* that affects FtsH protein production and colicin tolerance. *Mol Gen Genet.* **254**, 578 - 583

Ma, L., Kaserer, W., Annamalai, R., Scott, D.C., Jin, B., Jiang, X., Xiao, Q., Maymani, H., Massis, L.M., Ferreira, L.C., Newton, S.M., and Klebba, P.E. (2007) Evidence of ball-and-chain transport of ferric enterobactin through FepA. *J Biol Chem.* **282**, 397 - 406

Masaki, H., and Ogawa, T. (2002) The modes of action of colicins E5 and D, and related cytotoxic tRNases. *Biochimie*. **84**, 433 - 438

Masaki, H., and Ohta, T. (1985) Colicin E3 and its immunity genes. *J Mol Biol*. **182**, 217 - 227

Masaki, H., Toba, M., and Ohta, T. (1985) Structure and expression of the ColE2-P9 immunity gene. *Nucleic Acids Res*. **13**, 1623 - 1635

Matsuzawa, H., Ushiyama, S., Koyama, Y., and Ohta, T. (1984) *Escherichia coli* K-12 *toZ* mutants tolerant to colicins E2, E3, D, Ia, and Ib: defect in generation of the electrochemical proton gradient. *J Bacteriol*. **160**, 733 - 739

Milligan, JF., Uhlenbeck, OC. (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol* **180**, 51 - 62.

Mora, L., Diaz, N., Buckingham, R.H., and de Zamaroczy, M. (2005) Import of the transfer RNase colicin D requires site-specific interaction with the energy-transducing protein TonB. *J Bacteriol*. **187**, 2693 - 2697

Mora, L., Klepsch, M., Buckingham, R.H., Heurgue-Hamard, V., Kervestin, S., and de Zamaroczy, M. (2008) Dual roles of the central domain of colicin D tRNase in TonB-mediated import and in immunity. *J Biol Chem*. **283**, 4993 - 5003

Mora, L., Moncoq, K., England, P., Oberto, J., and de Zamaroczy, M. (2015) The Stable Interaction Between Signal Peptidase LepB of *Escherichia coli* and Nuclease Bacteriocins Promotes Toxin Entry into the Cytoplasm. *J Biol Chem*. **290**, 30783 - 30796

Nakano, H., Goto, S., Nakayashiki, T., Inokuchi, H. (2001) Temperature-sensitive mutations in various genes of *Escherichia coli* K12 can be suppressed by the *ssrA* gene for 10Sa RNA (tmRNA). *Mol Genet Genomics*. **265(4)**, 615 - 621

Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., and Buchanan, S.K. (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol*. **64**, 43 - 60

- Ogawa, T., Tomita, K., Ueda, T., Watanabe, K., Uozumi, T., and Masaki, H. (1999) A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons. *Science*. **283**, 2097 - 2100
- Paetzel, M. (2014) Structure and mechanism of *Escherichia coli* type I signal peptidase. *Biochim Biophys Acta*. **1843**, 1497 - 1508
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C., and Dalbey, R.E. (2002) Signal peptidases. *Chem Rev*. **102**, 4549 - 4580
- Papadakos, G., Wojdyla, J.A., and Kleanthous, C. (2012) Nuclease colicins and their immunity proteins. *Q Rev Biophys*. **45**, 57 - 103
- Pedersen, K., Zavialov, A. V., Pavlov, M. Y., Elf, J., Gerdes, K., Ehrenberg, M. (2003) The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell*. **112**, 131 - 140
- Qu, J.N., Makino, S.I., Adachi, H., Koyama, Y., Akiyama, Y., Ito, K., Tomoyasu, T., Ogura, T., and Matsuzawa, H. (1996) The *tolZ* gene of *Escherichia coli* is identified as the *ftsH* gene. *J Bacteriol*. **178**, 3457 - 3461
- Riley, M.A., and Wertz, J.E. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol*. **56**, 117 - 137
- Roos, U., Harkness, R.E., and Braun, V. (1989) Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Mol Microbiol*. **3**, 891 - 902
- Sakai, F., Sugita, R., Chang, J.W., Ogawa, T., Tsumadori, N., Takahashi, K., Hidaka, M., and Masaki, H. (2015) Transfer-messenger RNA and SmpB mediate bacteriostasis in *Escherichia coli* cells against tRNA cleavage. *Microbiology*. **161**, 2019 - 2028
- Shimizu, Y. (2012) ArfA recruits RF2 into stalled ribosomes. *J Mol Biol*. **423**, 624 - 631

Soelaiman, S., Jakes, K., Wu, N., Li, C., Shoham, M. (2001) Crystal structure of colicin E3: implications for cell entry and ribosome inactivation. *Mol Cell* **5**, 1053 - 1062.

Stephen P, Ye S, Zhou M, Song J, Zhang R, Wang ED, Giegé R, Lin SX. (2018) Structure of *Escherichia coli* Arginyl-tRNA Synthetase in Complex with tRNA^{Arg}: Pivotal Role of the D-loop. *J Mol Biol.* **430**, 1590 - 1606

Tanaka, N., Shuman, S. (2011) RtcB is the RNA ligase component of an *Escherichia coli* RNA repair operon. *J Biol Chem.* **286**, 7727 - 7731

Tomasz, M. (1995) Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol.* **9**, 575 - 579

Tomita, K., Ogawa, T., Uozumi, T., Watanabe, K., and Masaki, H. (2000) A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 8278 - 8283

Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A.J., Oppenheim, A.B., Yura, T., Yamanaka, K., Niki, H., et al. (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *EMBO J.* **11**, 2551 - 2560

Wakaki, S., Marumo, H., Tomioka, K., Shimizu, G., Kato, E., Kamada, H., Kudo, S., Fujimoto, Y. (1958) Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. *Antibiot Chemother (Northfield).* **5**, 228 - 240

Walker, D., Mosbahi, K., Vankemmelbeke, M., Kames, R., Kleanthous, C. (2007) The role of electrostatics in colicin nuclease domain translocation into bacterial cells. *J Biol Chem.* **282**, 31389 - 31397

Weis, F., Bron, P., Giudice, E., Rolland, JP., Thomas, D., Felden, B., Gillet, R. (2010) tmRNA-SmpB: a journey to the centre of the bacterial ribosome. *EMBO J.* **29**, 3810 - 3818

White, P., Joshi, A., Rassam, P., Housden, N.G., Kaminska, R., Goult, J.D., Redfield, C., McCaughey, L.C., Walker, D., Mohammed, S., Kleanthous, C. (2017) Exploitation of an iron transporter for bacterial protein antibiotic import. *J Proc Natl Acad Sci U S A*. **114(45)**, 12051 - 12056

Winther, K.S., Gerdes, K. (2011) Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7403 - 7407.

Yajima, S., Nakanishi, K., Takahashi, K., Ogawa, T., Hidaka, M., Kezuka, Y., Nonaka, T., Ohsawa, K., and Masaki, H. (2004) Relation between tRNase activity and the structure of colicin D according to X-ray crystallography. *Biochem Biophys Res Commun*. **322**, 966 - 973

石田亘修士論文(2001) コリシン D の活性ドメインの同定と酵素学的解析

酒井英子卒業論文(2012) tRNA 切断に対する細胞の恒常性維持を担う因子の探索

高橋一敏博士論文(2008) リボヌクレアーゼ型トキシンの構造と機能の研究

高橋聖矢修士論文(2011) tRNA 特異的リボヌクレアーゼコリシン D の酵素学的解析

寺本和矢卒業論文(2013) コリシン D の tRNA 切断機構の解明

妻鳥奈津子修士論文(2007) tRNA 特異的リボヌクレアーゼ、コリシン D の作用と大腸菌の細胞応答

謝辞

本論文は、東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程在学中に行った成果をまとめたものです。

本研究を行うにあたり、適切なご指導と実験する環境を与えてくださり、科学に対する姿勢を教えてください、東京大学大学院農学生命科学研究科分子育種学研究室教授正木春彦先生、准教授日高真誠先生、助教小川哲弘先生、そして酵素学研究室教授伏信進矢先生、助教荒川孝俊先生と山田千早先生に心から感謝を申し上げます。先生達のおかげで有意義な研究室生活を送ることが出来ました。本当にありがとうございました。

本研究における X 線結晶構造解析における実験とデータ収集・解析は、東京大学定量生命科学研究所先端定量生命科学研究部門、蛋白質複合体解析研究分野准教授深井周也先生、助教佐藤裕介先生と山形敦史先生に行って頂きました。結晶化に関する多数の御助言も頂き、深く感謝いたします。

有益な御助言でご支援頂いた分子育種学研究室と酵素学研究室の後輩の皆様全てに本当に心から御礼申し上げます。

張榮維

2018 年 秋