

タイプ6分泌システムのVgrG蛋白質C末端ドメインの構造 Structure of C-terminal domain of VgrG protein of T6SS

内田一也, 金丸周司*

東京工業大学 生命理工学院, 〒152-8550 東京都目黒区大岡山 2-12-1 M6-11

Kazuya Uchida, Shuji Kanamaru*

Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, M6-11 2-12-1
Ookayama, Meguro-ku, Tokyo, 152-8550, Japan

1 はじめに

バクテリアのタイプ6分泌システム (T6SS) はエフェクターと呼ばれる蛋白毒を他の細胞に注入する注射のような超分子複合体である。この T6SS は遺伝子クラスターを形成し病原性バクテリアに広く見いだされ、その病原性との関係が注目されている。一方で、T6SS の構造は収縮性ファージの尾部に類似しており、その構造と動作メカニズムについても興味を持たれる。

T6SS 構成蛋白質のひとつである VgrG 蛋白質は T4 ファージの注射針複合体である gp5-gp27 複合体のホモログであり、T6SS においても同様の機能を担っていると考えられる。T4 ファージの gp5 の C 末端ドメインは VXGXXXXX の 8 残基が繰り返す配列を有し、その構造は特徴的な 3 本鎖 β -ヘリックスを形成する。一方、VgrG 蛋白質の C 末端ドメインは VGXXXXXX の 8 残基が繰り返す配列を有するが、その立体構造は報告がない。

そこで本研究では、大腸菌 O157 の VgrG 蛋白質の C 末端ドメインを発現・精製・結晶化を行い、結晶構造解析により立体構造を明らかにした。

2 実験

【結晶化】

大腸菌 O157 の VgrG 蛋白質の C 末端ドメイン (VgrG1C⁴⁶⁷⁻⁶³³) をコードする遺伝子を PCR により増幅し、発現ベクターに組み込み大腸菌にて大量発現を行った。各種クロマトグラフィーにて VgrG1C⁴⁶⁷⁻⁶³³ の精製を行った後に、トリプシンによる限定水解によって VgrG1C⁵⁶¹⁻⁶³³ を得た。同様の方法で SeMet 置換体も精製し、初期結晶は CrystalScreen Cryo で得られた。最終的に、35%(v/v) ethanol, 100mM Tris pH8.5, 50mM MgCl₂ の条件で得られた結晶を用いて回折データを収集した。

【X線回折データの収集】

PF の構造生物学ビームライン PF BL-1A を用いて X 線回折強度データの収集を行った。結晶化溶液に基づいて作成した 40%(v/v) ethanol, 100mM Tris pH8.5, 50mM MgCl₂ にソーキングして凍結し、1.95Å 分解能のデータを得ることができた。

【構造解析】

得られたデータセットを XDS で処理し、SCALA でスケーリング、phenix.autosol を用いて Se 原子を用いた SAD 法で位相を決定した。phenix.autosol の初期モデルをもとに、Coot を用いてモデルを構築し、Refmac5 と phenix.refine にて構造精密化を行った。

3 結果および考察

得られた VgrG1C⁵⁶¹⁻⁶³³ の結晶構造は、3 本鎖 β 構造を形成し、その大まかな構造は T4 ファージ gp5 の C 末端 β ヘリックスと類似していたが、gp5 の C 末端 β ヘリックスとは異なり、VgrG1C⁵⁶¹⁻⁶³³ は逆平行 β シート 6 本が三角柱の 1 面を形成する β ヘリックス構造であった (図 1)。繰り返し配列中に現れる Val-Gly で逆平行 β シート間のターン構造を形成していた。また、三角柱内部は gp5C 末端型 β ヘリックスに比べ、約 3 Å ほど狭くなっていた。

すでに報告されている β ヘリックスを比較し、そのアミノ酸配列と構造の相関を調べたところ、そのコンセンサス配列には明らかな違いがあり、 β ヘリックスを持つと予想される領域の平行 β 型、逆平行 β 型を予測することができた[1]。

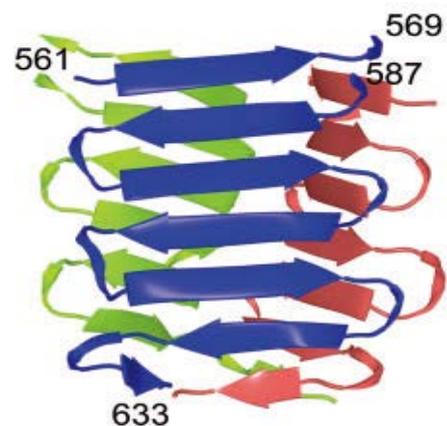


図 1 : VgrG1C⁵⁶¹⁻⁶³³ の構造。

4 まとめ

本研究では、大腸菌 O157 の VgrG1C⁵⁶¹⁻⁶³³ の結晶構造を 1.95Å 分解能で決定することができた。その構造は逆平行 β シート 6 本が三角柱の 1 面を形成す

る β ヘリックス構造であった。この結果から、 β ヘリックスを持つと予想されるアミノ酸配列から平行 β 型, 逆平行 β 型を判断することが可能となった。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費若手研究 B「病原菌の新規「タイプ 6 分泌装置」蛋白質群にみられる収縮性ファージと共通の立体構造」(21770164)、基盤研究 C「病原性細菌特異的ファージの宿主認識と収縮性ファージ尾繊維構成蛋白質の構造生物学」(25440066) の支援を受けて行われた。

参考文献

[1] K. Uchida *et al.*, J Biochem. **155**(3):173-82 (2014)

* skanamar@bio.titech.ac.jp