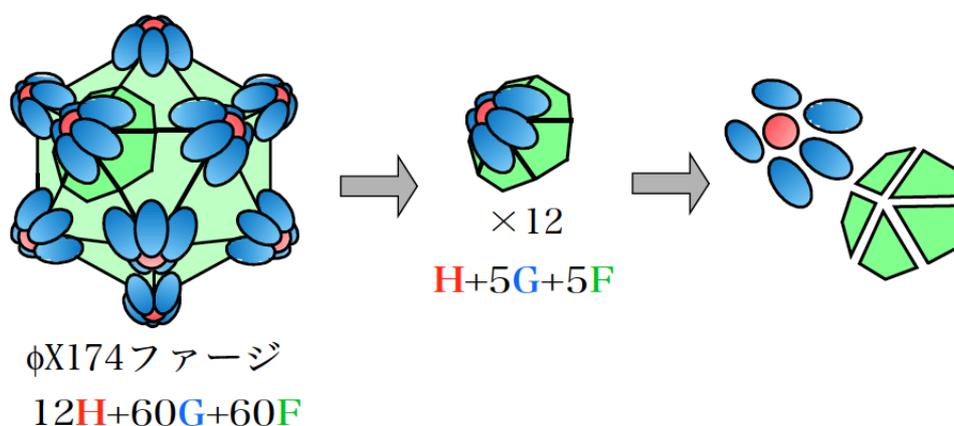


生理活性化学研究室（担当：稲垣穰）では、創薬化学研究室（担当：増田裕一）と共同で研究室を運営しています，2つで1つの研究室と考えてください。ゼミも研究発表もコンパも一緒に行っています。主に有機化学による合成を主体とする創薬増田裕一准教授と有機化学的な生化学を主体とする生理活性稲垣穰教授の研究を行っています。

## 生理活性化学研究紹介

### ウイルスの宿主細胞糖鎖の認識機構の研究



教授 稲垣 穰

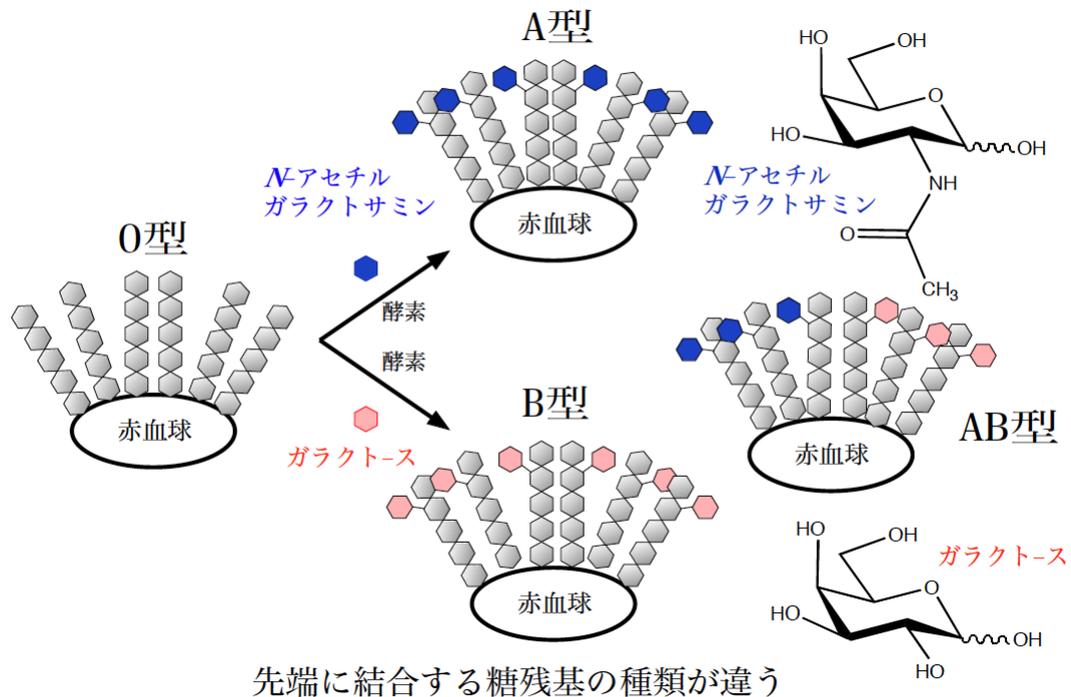
生理活性化学研究室では，平成 26 年から 3 年間に渡って，文部科学省からの研究費を受けて，バクテリオファージ  $\phi$ X174 の宿主認識の解明に関する研究の中でも，宿主大腸菌の表面を覆うリポ多糖に非天然の糖鎖を作らせてファージの認識を研究するプロジェクトを実施してきました。この研究テーマは大変に工夫の必要なプロジェクトですが，成功した場合の成果も大変大きいことから，ここ数年は，このファージの宿主認識の研究に集中しようと考えています。

研究の概要を説明していきます。

#### 1 糖鎖は細胞の顔！

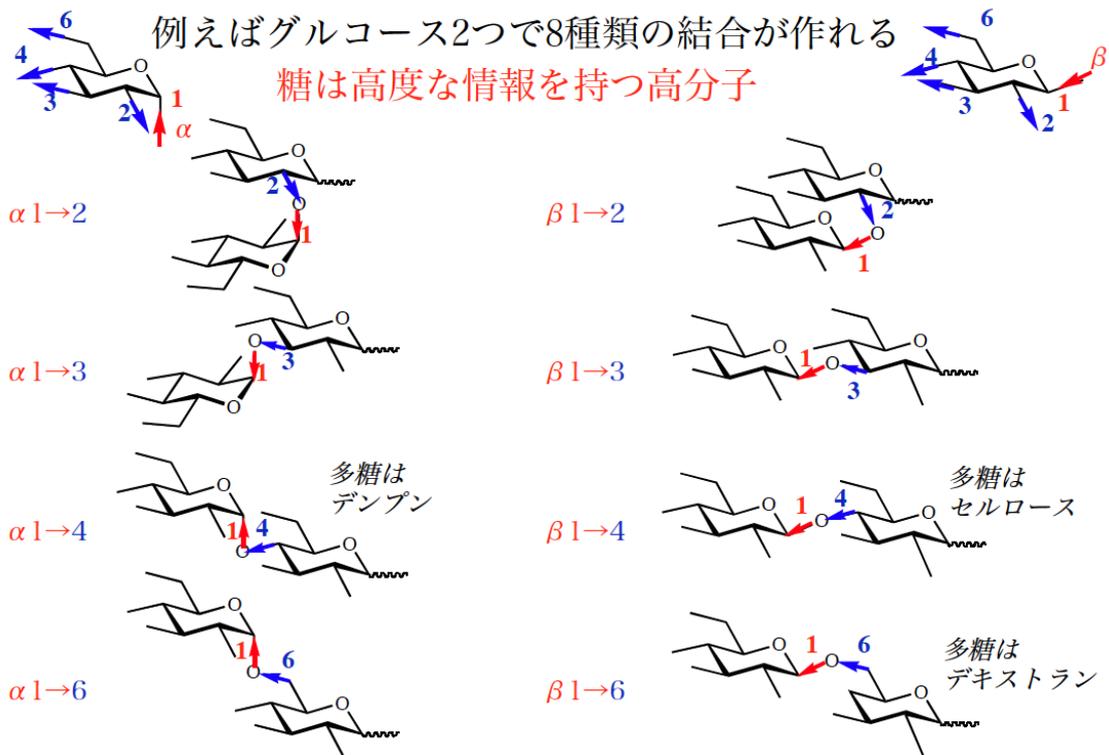
ヒトの血液型は糖鎖で決まっています。赤血球の表面に配列した糖タンパク質の糖鎖の基本的な 6 糖に *N*-アセチルガラクトサミンを結合する糖転移酵素因子（遺伝子）を持つヒトは A 型です。一方，ガラクトースを転移する酵素遺伝子を持つヒトが B 型です。また，その両方の糖転移酵素の因子（遺伝子）を持てば AB 型となり，赤血球の表面には，GalNAc と Gal の両方の残基が結合します。それらの因子を両方とも持たないヒトが O 型です。O 型の血液が A, B や AB 型のヒトに緊急的に輸血できると言われる理由は，O 型糖鎖には，抗血清が反応する糖残基がどちらも含まれないためです（現在は行われません）。

## 糖鎖は細胞の顔！ 血液型は糖鎖で決まっている！



### 2 糖は高度な情報分子-例えばグルコース 2 つで 8 種類の結合がある

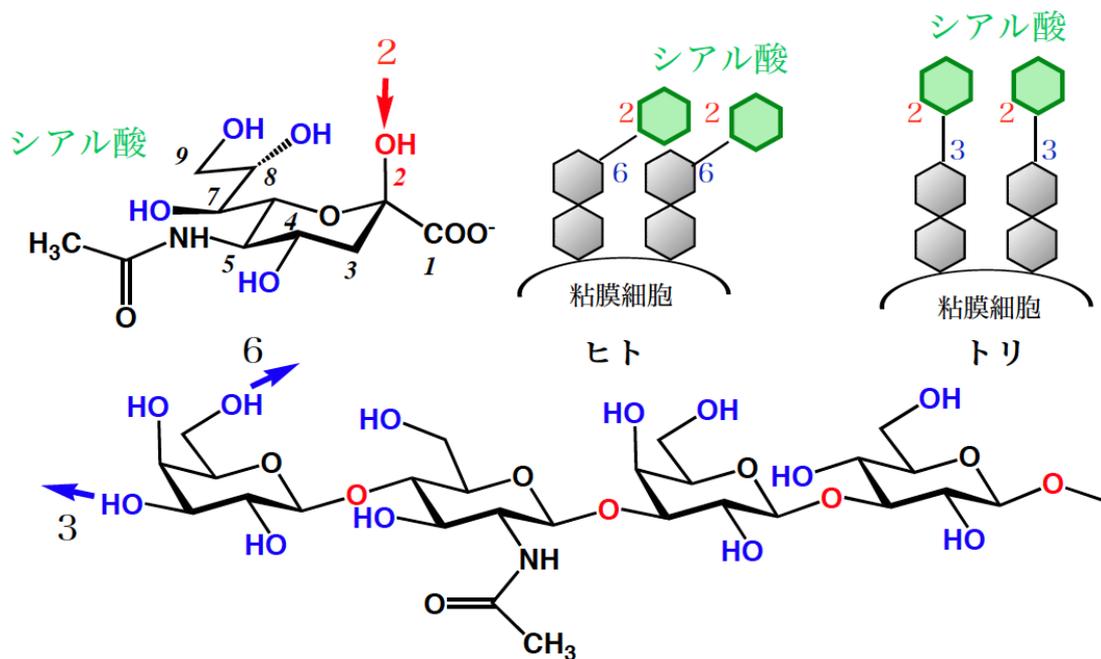
たとえば、グルコース 2 残基を結合する場合を考えると、糖と糖結合をグリコンド結合と言いますが、まず、1 位が図の赤い矢印の様に、結合を受け止める（親電子種になる）場所になり、このとき  $\alpha$  と  $\beta$  の 2 通りの方向があります。一方、2,3,4,6 位は青い矢印の様に結合を作っていく側（求核種になる）になり、そこで 4 種類あることから、合計 8 通りの結合を作ることができます。典型的な例として、 $\alpha$  1,4 結合の多糖はデンプンやアミロースであり、 $\beta$  1,4 結合はセルロース、 $\beta$  1,6 結合はデキストランです。 $\beta$  1,3 結合は、細菌や酵母の細胞壁に多く、そのため一般にヒトにアレルギーを誘起します。この結合方式いかんで、栄養になったり、食物繊維になったり、アレルギー源になったりする訳です。



### 3 インフルエンザも細胞表面の糖を認識している

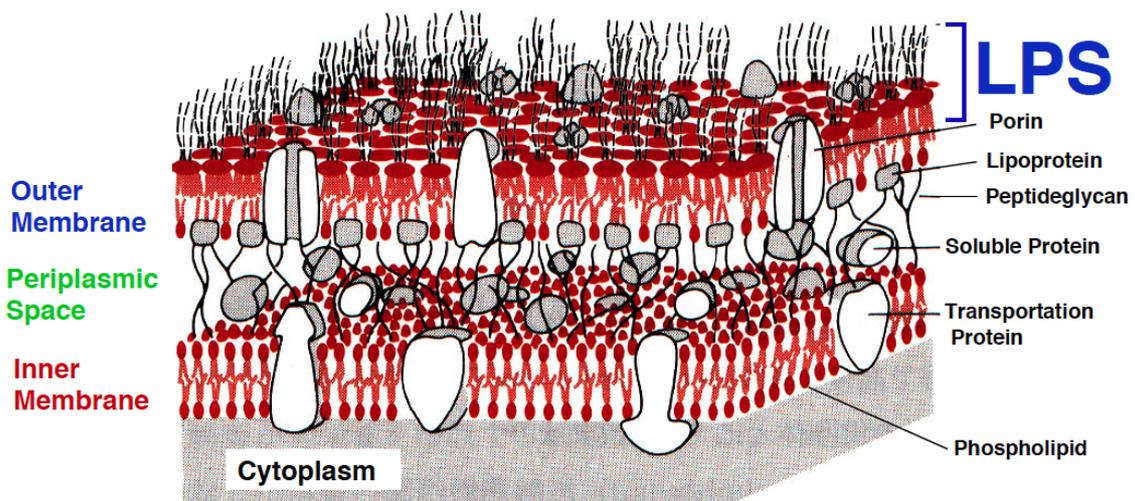
インフルエンザウイルスは、私たちの喉の上気道粘膜の細胞に感染しますが、トリとヒトでは、粘膜細胞に並んでいる糖鎖の結合が僅かに異なります。どちらもシアル酸と呼ばれる 3-デオキシ型の 9 炭糖が認識の鍵となりますが、ヒトでは、シアル酸が  $\alpha 2,6$  結合であるのに対して、ニワトリでは、 $\alpha 2,3$  結合になっています。つまりシアル酸を結合する方向の違いがヒトとトリの違いです。この僅かな違いが重要ですが、これを乗り越えるウイルスが出現することで、トリインフルエンザがヒトに襲いかかってくるパンデミック（大流行）を科学者は恐れています。

## インフルエンザウイルスが認識するトリとヒトの違い



### 4 細菌の表面も同じく糖鎖で覆われている

大腸菌など、グラム陰性菌の表面は、リポ多糖（LPS: Lipopolysaccharide）で覆われています。細胞膜の外にペプチドグリカン（細胞壁）の層がありますが、グリカン層は薄く、その代わりグラム陽性菌には無い外膜があり、その膜の外側葉は、リポ多糖の糖鎖がびっしり覆っています。丁度魚の鱗の様なものと思ってください。



### Triple Layered Surface Structure of the Gram-Negative Bacteria

Illustration from Molecular Biology of the Cell, 2nd Ed.

## 5 LPSはグラム陰性菌の顔

LPSは、言わばグラム陰性菌の顔の役割を果たします。動物にとっては、外部から侵入してくる雑菌や病原菌を表す物質（マーカー）であり、一方バクテリアに感染するウイルス（バクテリオファージ）にとっては、その菌が自分の宿主かどうか（感染可能か？）を見極める受容体分子（レセプター）として機能します。

バクテリオファージは、主にA-Fの6種類が知られており、月面着陸船の様な形で有名なT4ファージはAタイプのみオビリダエ、尾の長い $\lambda$ ファージは、Bのシフォビリダエに属します。T7などの尾の短い大型ファージは、ポドビリダエと呼ばれてCタイプです。稲垣は、超小型のDNAファージで、Dタイプのマイクロウイルス科（マイクロビリダエ）の代表と言える $\phi$ X174を研究しています。Q $\beta$ の様なRNAウイルスのEタイプ、あるいは、繊維状のFタイプには、有名なm13やfdなどが属しています。

## LPSはグラム陰性細菌表層の”顔”

リピドA部分の構造は共通

R-コア糖鎖は大腸菌で5種類、サルモネラ菌で1種類

O-抗原多糖は100種類以上のバリエーションあり

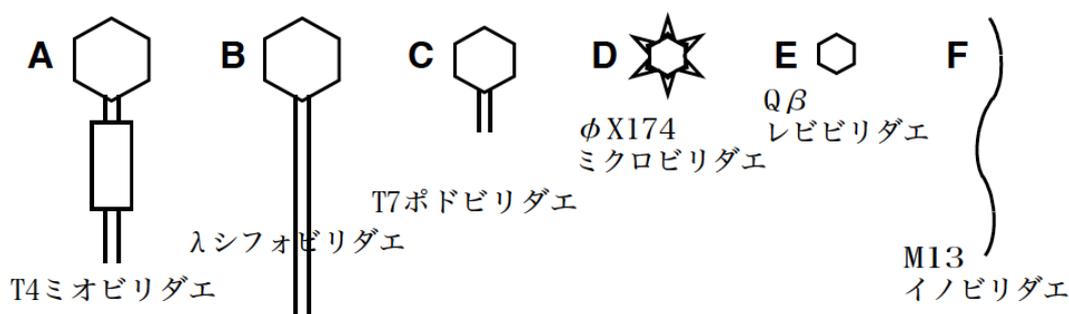
動物にとってLPSは、

内毒素（致死毒性、発熱性、組織壊死反応、免疫活性化、敗血症）

免疫反応の抗原（抗原性と病原性が密接に関連）

バクテリオファージにとってLPSは、

標的分子”レセプター”（宿主選択、認識、感染）

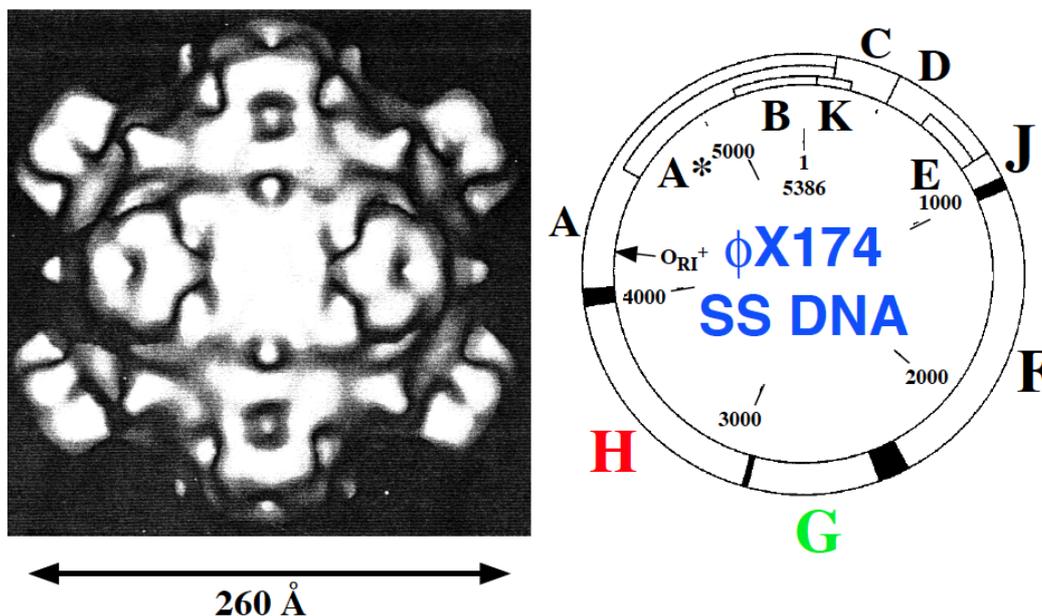


Bradleyによるバクテリオファージの形態分類

## 6 $\phi$ X174は、最小のDNAウイルス

Dタイプの代表である $\phi$ X174は、非常に小さく、直径約26nmの正二十面体型をしています。T4ファージの頭部の直径が120nmほどありますから、その1/5しかなく、最小のDNAウイルスです。遺伝子は1本鎖の環状DNAで、わずか5386塩基（一本鎖なので塩基対ではない）で、遺伝子の数は11個です。ファージ粒子は、F,G,H,Jの4つのタンパク質と一本のssDNAだけで構成されるシンプルな極みです。それ以外の遺伝子にコードされるタンパク質は、増幅と組み立て、菌を壊して出る際に働きます。これは限界まで簡略化された姿で、A遺伝子の中にA\*, B, K遺伝子が、また、Dの中にEがトリプレットの読み枠をずらしてコードされています。

# Bacteriophage $\phi$ X174



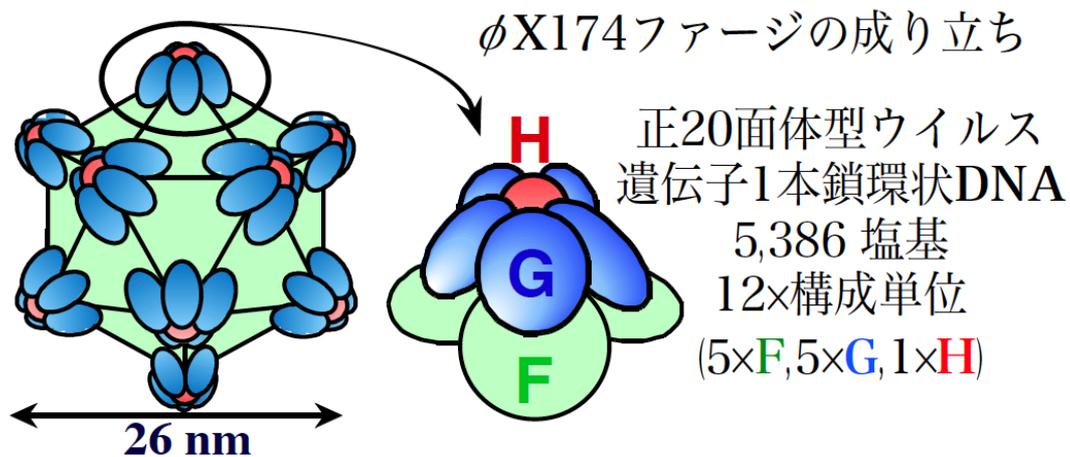
Reconstructed Picture by Electron Microscopy. Genetic Map of RF DNA of  $\phi$ X174.

Olson, N. H., et al., *J. Struc. Biol.* (1992).

Hayashi, M., et al., *The Bacteriophages* (1988).

## 7 ファージを構成するのはたった4つのタンパク質

4つのタンパク質は、20面体をFタンパク質が形成し、頂点に飛び出したスパイク突起を5分子のGと1分子のHタンパク質で作っています。Jタンパク質は、DNAを折りたたむパッキングを担っています。複雑なウイルスは、もちろん複雑ですが、単純なウイルスも簡単ではありません。度を越した小ささと、その割には複雑な感染の仕組み、細胞内で複製されてからの組み立ての段階など、まだまだ不明な点が多く含まれます。

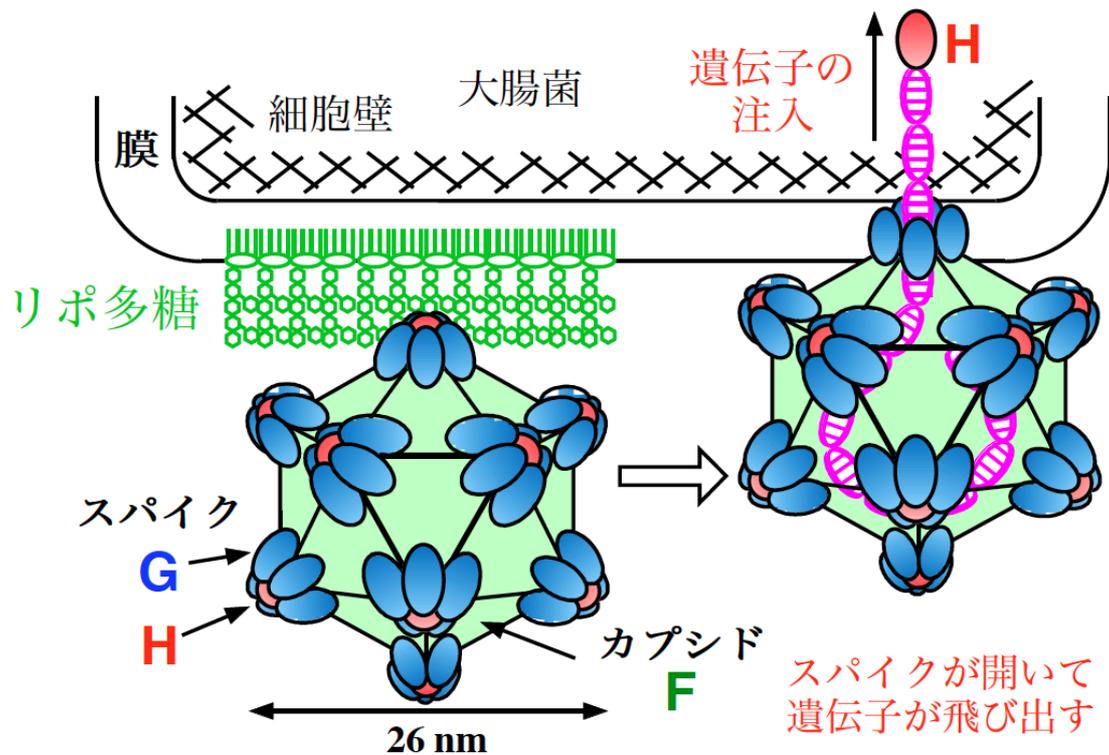


タンパク質	コピー	分子量 (kDa)	役割
F	60	50	20面体カプシド
G	60	18.5	スパイク5量体
H	12	37	スパイク栓
J	60	4	DNA折り畳み

8 ファージは、大腸菌の LPS を認識して遺伝子を放出・感染する

ファージの推定感染機構は、スパイクタンパク質で宿主菌の表面に並んだ LPS の糖鎖を認識し、鍵と鍵穴が一致するとエクリップスと呼ばれるタンパク質の立体構造の変化を起こして、DNA を放出します。生物現象的には、スパイクタンパク質が重要であることが、それらを欠損させたファージに感染力がないことから証明されていますが、そのときどのように宿主細菌を選択しているのか？有機化学的・物理化学的に何が起ると感染するのか？φX174 は、もっとも研究・解明の進んだウイルスの一つですが、感染機構でさえちゃんと判っていません。

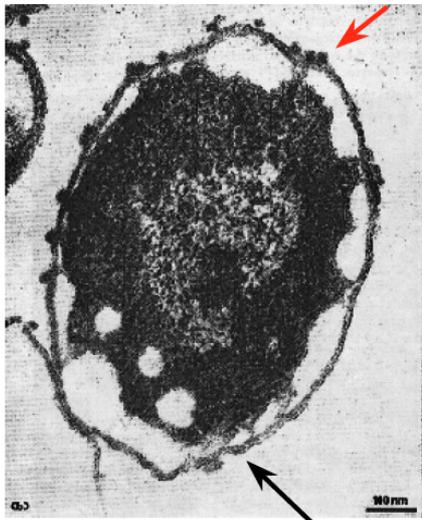
## φX174ウイルスの推定感染機構



### 9 小さくてもちゃんとウイルス

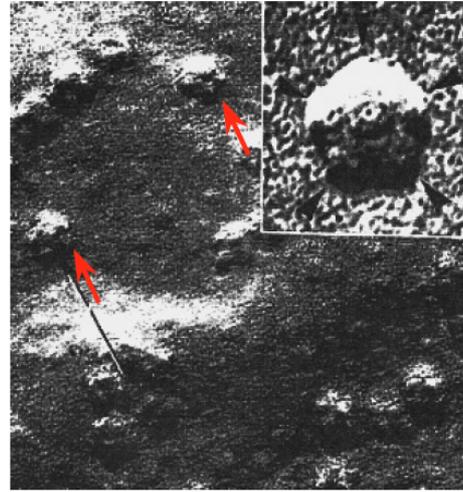
写真左は、バイエルらによる電子顕微鏡写真です。輪切りにした大腸菌の断面の周囲にゴマ粒の様なφX174（赤矢印の先）が見えます。こんなに小さいのです。大腸菌の外膜と内膜が浸透圧の関係で離れて（原形質分離の様な状態）写っていますが、ファージの粒子が外膜と内膜が連絡している、バイエルジャンクションと呼ばれる場所に集中して結合しているのが判ります。遺伝子を注入するために、内膜と外膜が近づいている場所を選んでしていると予想されます。写真右は、ブラウンらの電子顕微鏡です。電顕の解像度がもう限界なので不明瞭ですが、ファージが20面体の角のスパイクの突起部分から垂直に大腸菌の膜面に刺さっている様子が窺えます。このことから、感染する際にスパイク突起が認識に働くと考えられてきました。

## 大腸菌に吸着して感染するバクテリオファージφX174



大腸菌断面

1969年バイエルによる電顕写真



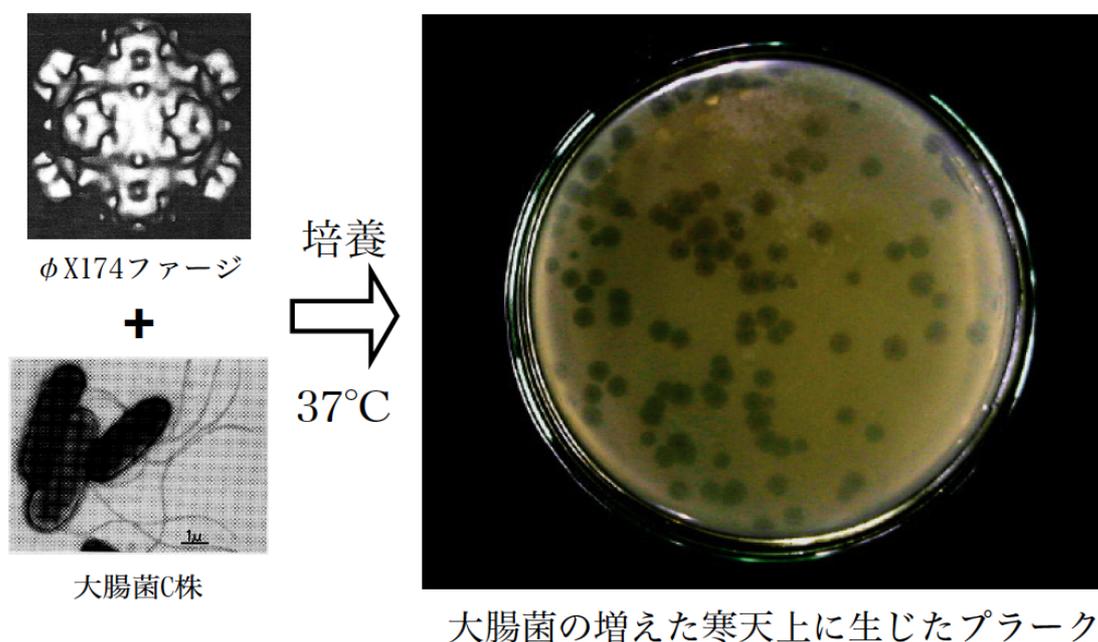
1970年ブラウンによる電顕写真

### 10 細菌細胞を破壊（殺して）外に出ることから寒天培地にプラークができる

ファージは宿主菌に DNA を挿入して感染すると、内部で DNA の複製とカプシドタンパク質の発現を起こし、ファージの娘粒子が組み立てられます。その後、大腸菌を溶かす、E タンパク質が発現して内部から菌を壊し、外へ出ます。

図では、黄色に見える大腸菌が一面に生えたローン（芝生）にところどころ孔があります。これは、ファージ増殖して菌を壊して外へ出て、さらにその周囲の菌に感染して増殖・溶菌を繰り返すことで、1 個のファージの居た場所から同心円に死滅するため、透明に見えるもので、プラークと呼びます。このプラーク数を数えると、もとのファージ個数が判ります。

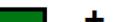
## φX174の増殖したプラーク



### 11 φX174は、決まったの配列の糖鎖を認識して宿主を選択する

LPSには、外膜に根を下ろすために脂肪酸を結合したリポD Aと呼ばれる糖脂質から始まり、内部コア糖鎖、外部コア糖鎖の順に生合成されます。そして、O-抗原多糖をもつ株をスムーズ株、持たない株をラフ株と呼びます。ヒトに病原性をもつ細菌は、通常O-抗原多糖を持ち、免疫をすりぬけたり、ごまかしたりする能力をもっていて、ちなみに157番目に見つかったO-抗原多糖をもつ大腸菌をO-157と呼びます。φX174が感染するのは、O-抗原多糖を持たないラフ株のなかで、外部コア糖鎖までが保存された12糖をもつRa型菌と一残基だけ欠けたRb1型菌に属する菌に限られます。φX174の仲間には、もっと短いRb、Rc株に感染できるものも居ますが、大腸菌K-12株には、Raの糖鎖を持っているにも関わらず感染できません。一方、ファージU3、α3やφKなどK-12株に特異的に感染するグループが居て、この違いがどうして起こるかもまだ未解明です。

Table Host Selectivity of Isomeric Phages of Microvirus Family to Some Enterobacteria

Strain	O-Repeat	R-core		Lipid A	φX174	S13	G4	G6	G13	U3	α3	φK
		Outer	Inner									
<i>E. coli</i> C	Ra				+	+	+	+	+	-		
<i>E. coli</i> C/15	Rb <sub>1</sub>				-	+	+	+	+			
<i>E. coli</i> B	Rb <sub>3</sub>				-	-	-	-	+			
<i>E. coli</i> F470	Ra				+	+	+	+	+			
<i>E. coli</i> F576	Ra				+	+	-	+	+			
<i>E. coli</i> F653	Ra				+	+	-	+	+			
<i>E. coli</i> F2513	Ra				+	+	+	+	-			
<i>E. coli</i> K12 W3100	Ra				-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. typhimurium</i> SL1034 SR					-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i> TV119	Ra				+	+	+	+	+			
<i>S. typhimurium</i> SL733	Rb <sub>1</sub>				+	+	-	+	+			
<i>S. typhimurium</i> TV160	Rb <sub>2</sub>				-	+	-	+	+			
<i>S. typhimurium</i> TV148	Rb <sub>3</sub>				-	-	-	+	+			
<i>S. typhimurium</i> SL684	Rc				-	-	-	+	+			
<i>S. typhimurium</i> SL1032	Rd <sub>1</sub>				-	-	-	+	-			
<i>Sh. flexneri</i> 4bR	Ra				+	+	-	+	+			

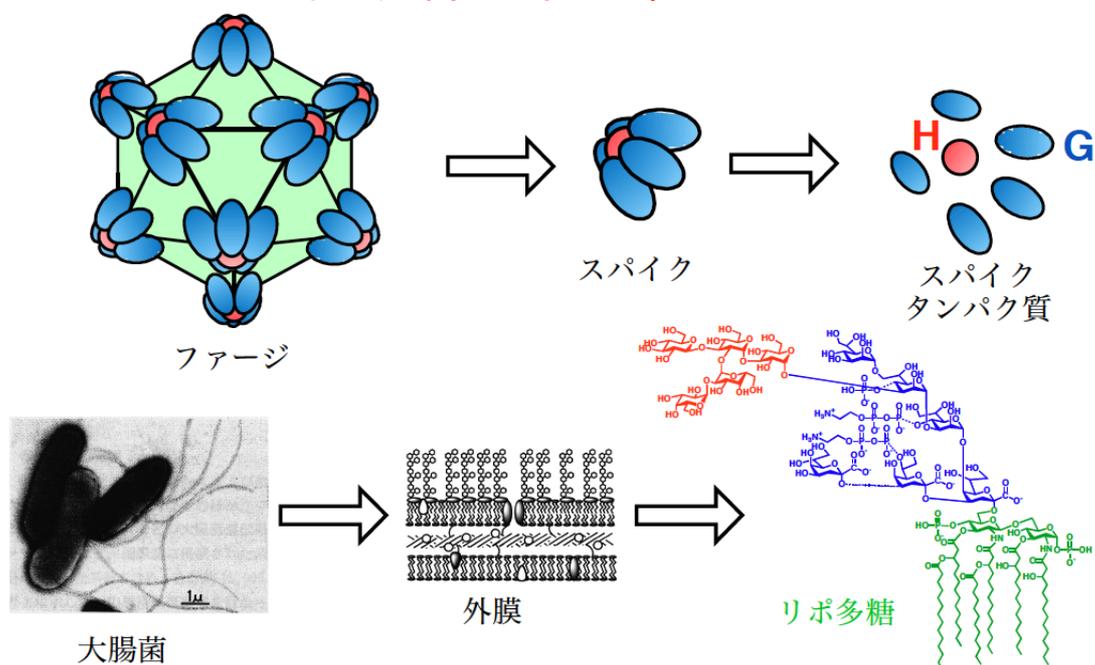
Ref. Lindberg, A. A. Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell, 289-356 (1977)

12 フェージの感染メカニズムをパーツに分解して試験管の中 (*in vitro*) で解明する

そこで稲垣は、三重大学に職を得た 1993 年から、フェージの宿主認識に興味を持ち、LPS の糖鎖を化学的に純粋合成する研究を始めました。しかし、外部コア糖鎖の 4 糖を作ることはできましたが、さらに複雑で混み合った 5 糖を合成することが出来ませんでした。そこで、大腸菌を大量に培養して細菌から LPS を取る方法に方針を変えました。そうして得られた LPS を使うことで、細菌の細胞を使う *in vivo* の方法から、試験管の中でフェージの相互作用（結合するかしないかを測る）を研究する *in vitro* の研究に変えていったのです。次に、フェージの遺伝子をクローニングして、スパイクタンパク質を遺伝子工学の手法で組み替えして大腸菌に作らせる方法を成功させました。ここから、フェージと LPS を構成する物質をさらにさらに部品に分解して、それぞれの相互作用をで調べる方向に進むことになりました。

ウイルスと大腸菌の部品（パーツ）が結合するか？

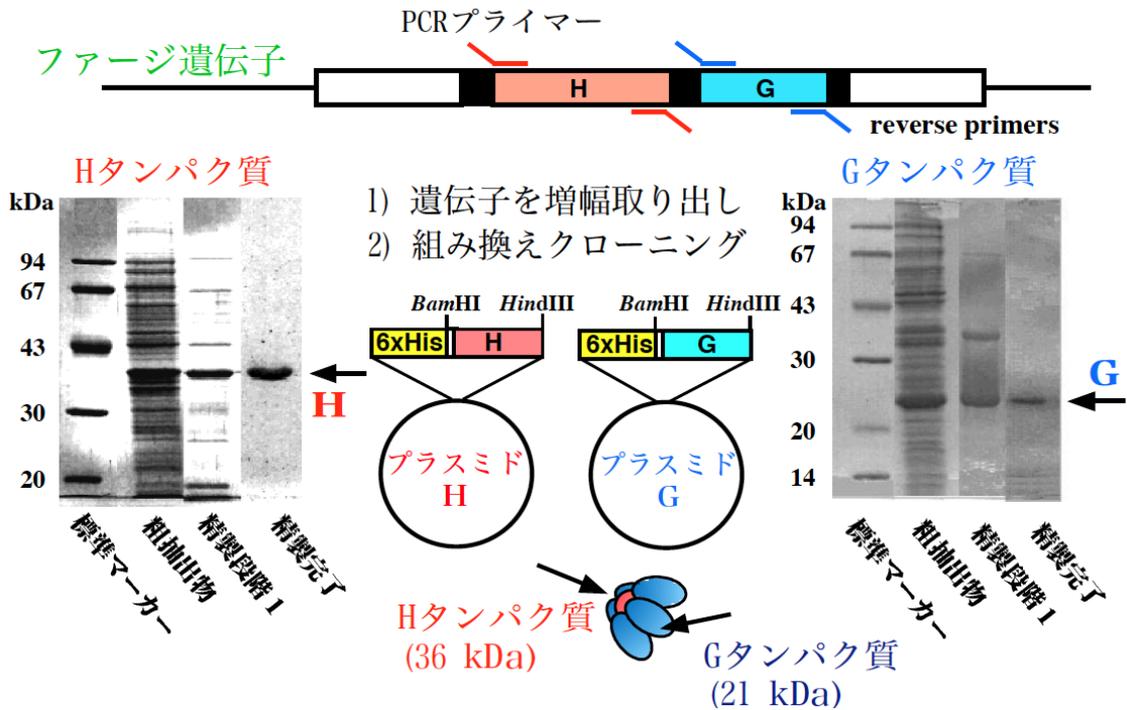
試験管の中で確かめる！



### 13 部品造りその1 遺伝子組み換えによる純粋なスパイクタンパク質の調製

φX174 のゲノム遺伝子からスパイクタンパク質 H や G をコードする部分をクローニングして、遺伝子組み換えで発現プラスミドに組み込み、タンパク質を大腸菌に作らせて精製する方法を確立しました。

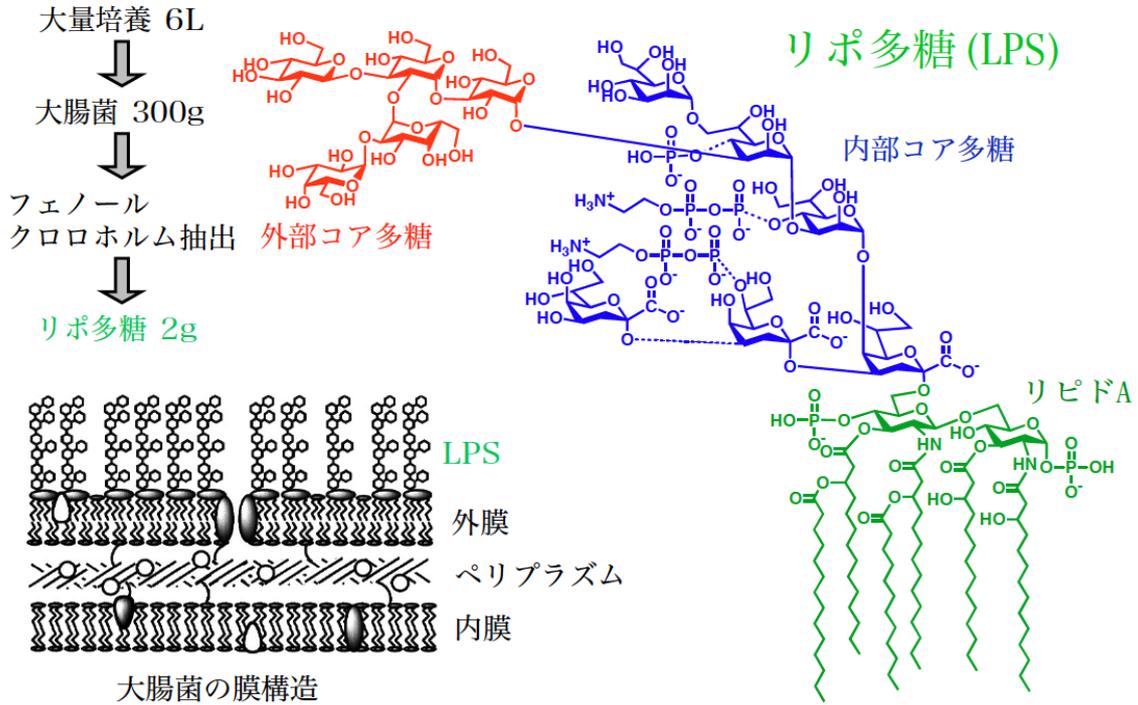
## 遺伝子組み換え技術によるファージタンパク質の調製と精製



### 14 部品造りその2 大腸菌のLPSの大量調製

大腸菌を大量培養装置（ジャーファメンター）で培養し，6Lの培地から300gほどの大腸菌を得て，そこからLPSを純粋に取り出すことに成功しました。収率は，大腸菌の重量の3%程度と幸い多く，得られたLPSの糖鎖構造は，大変均一で綺麗であることが判りました。生体成分は大変複雑です，合成も良いが天然物から工夫すれば良いものが得られる場合もあることを学びました。

## 宿主大腸菌の表層のファージ受容体を取り出す



### 15 スパイクタンパク質と LPS の結合が宿主選択制を説明する

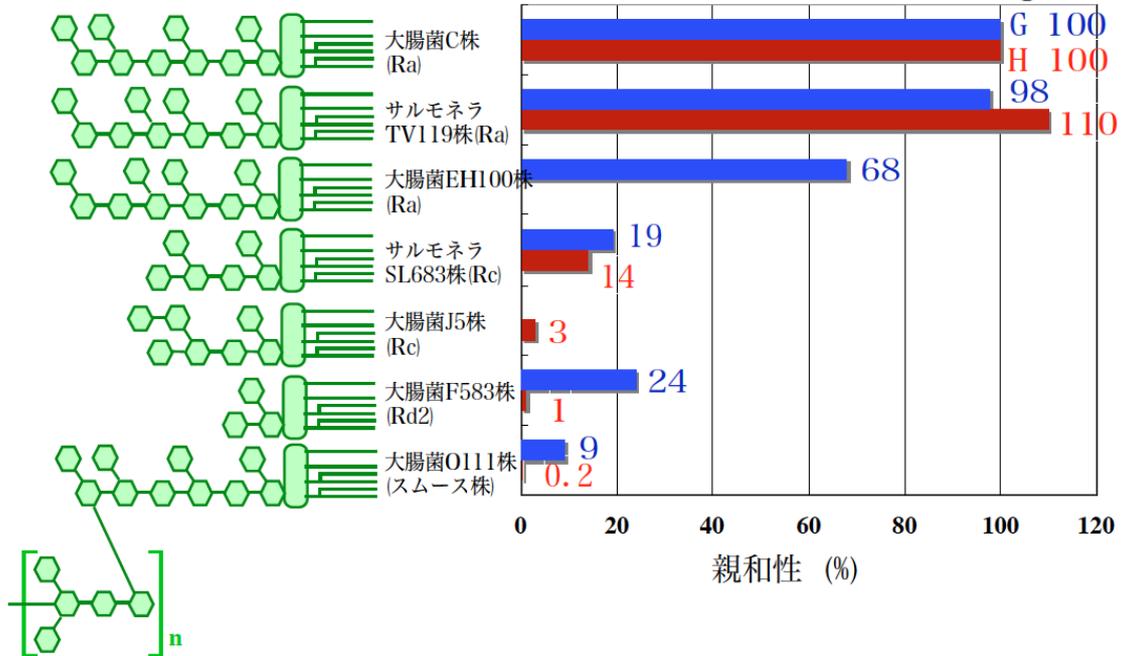
スパイクタンパク質の2種類 G と H という異なる LPS が結合するかを酵素リンクプレートアッセイ法(ELISA)を使って調べました。

グラフのバー上から、大腸菌 C 株、サルモネラ菌 TV119 株、大腸菌 EH100 株は、宿主となり  $\phi$ X174 の感染を受ける菌から LPS を取ったものとスパイクタンパク質が結合することが判ります(グラフの数値が大きいほど良く結合する)。一方、糖鎖が短いサルモネラ SL683(Rc)株、大腸菌 J5 株(Rc)、大腸菌 F583 株 (Rd2) など、非宿主の株の LPS がスパイクタンパク質との結合が弱いことがあきらかになりました。また、糖鎖が長すぎる 大腸菌 O111:B4 株の LPS もほとんど結合を示しませんでした。このとき、G タンパク質は、糖鎖の短い Rc 型や Rd2 型の LPS と弱いながら結合を起こす(19-27%)ことから、すぐに結合が小さくなる H タンパク質に比べて、LPS 糖鎖内側部分の内部コアを選択的に認識すると考えました。つまり、スパイクタンパク質が異なると、認識する糖鎖の部分が異なると予想できました。

## 糖鎖の違いとタンパク質の親和性の変化



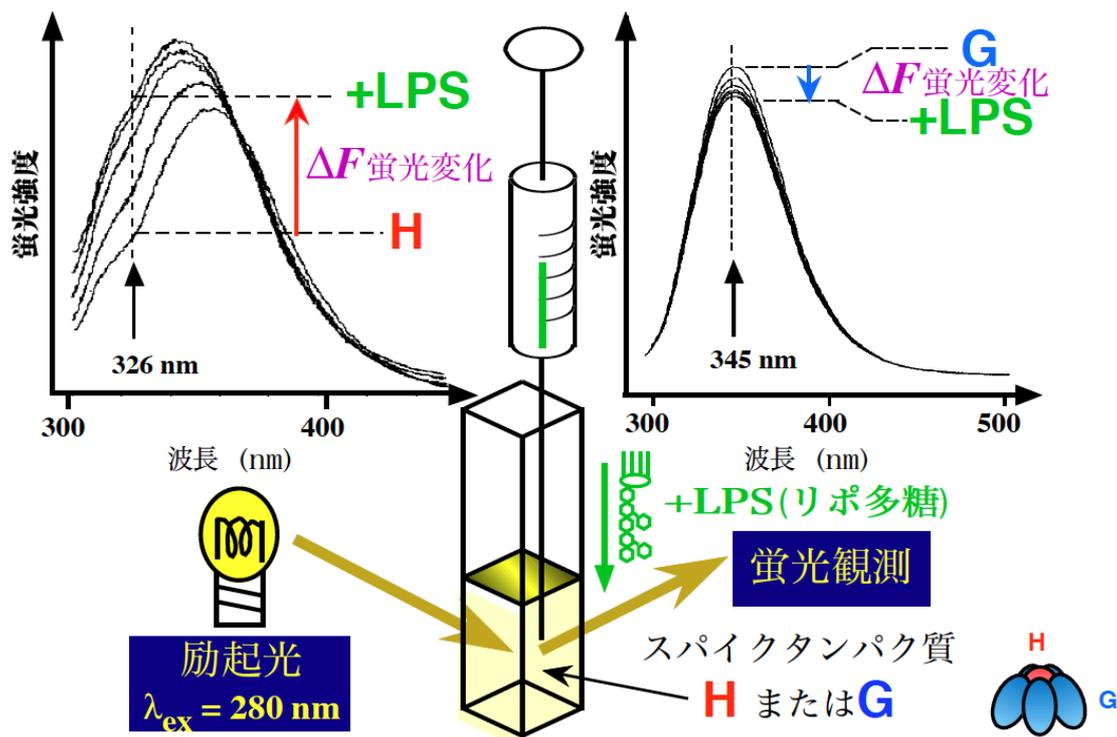
各種菌株由来のLPS



### 16, 17 LPS とスパイクタンパク質の結合の定量的評価

タンパク質には、人間の目に見えない領域にごく弱い蛍光をもっています。スパイクタンパク質 H や G をセルに入れ、蛍光を観測しながら LPS を徐々に加えていきます。すると H タンパク質は、326nm 付近の蛍光強度が増加する方向に、G タンパク質は、345nm 付近の蛍光強度が徐々に低下することが判りました。

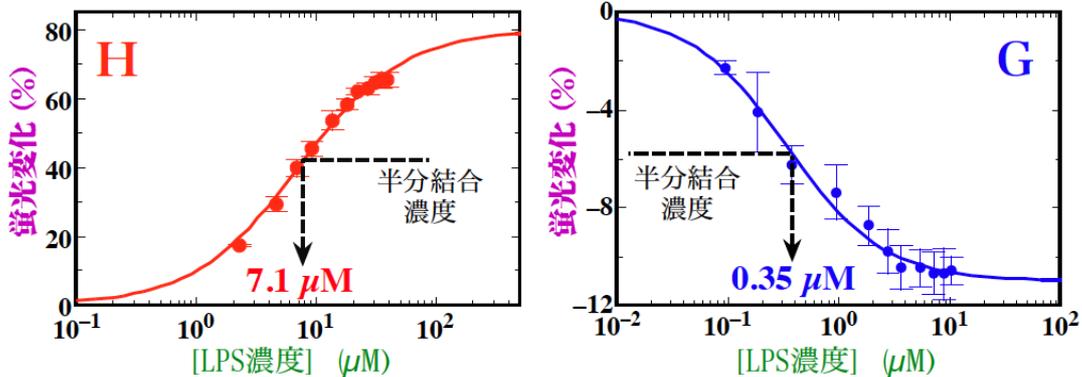
蛍光強度の変化を LPS 濃度に対してプロットすると 17 図の様になります。シグモイド曲線が画かれ、飽和曲線の数学モデルに従う結合が観測されます。曲線の中央点が半分結合濃度で酵素反応で言う  $K_m$  に匹敵します。H タンパク質の半分結合濃度は  $7.0\mu\text{M}$ 、G タンパク質のそれは、 $0.35\mu\text{M}$  であることから、G タンパク質は、H タンパク質より約 20 倍強く宿主の LPS と結合すると計算されます。つまり、H も G も両方とも LPS と結合しますが、H よりも G の結合がさらに強いため、スパイクは、H 部分で結合すると、G の力で大腸菌の膜に押し込まれていくと考えられます。



蛍光計によるスパイクタンパク質とリポ多糖の結合の観察

## スパイクタンパク質とリポ多糖の結合実験結果

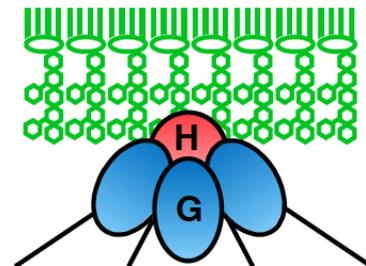
タンパク質 + LPS  $\rightleftharpoons$  複合体 (蛍光変化)



半分結合濃度が小さいほど、相互作用が強いことを示す！

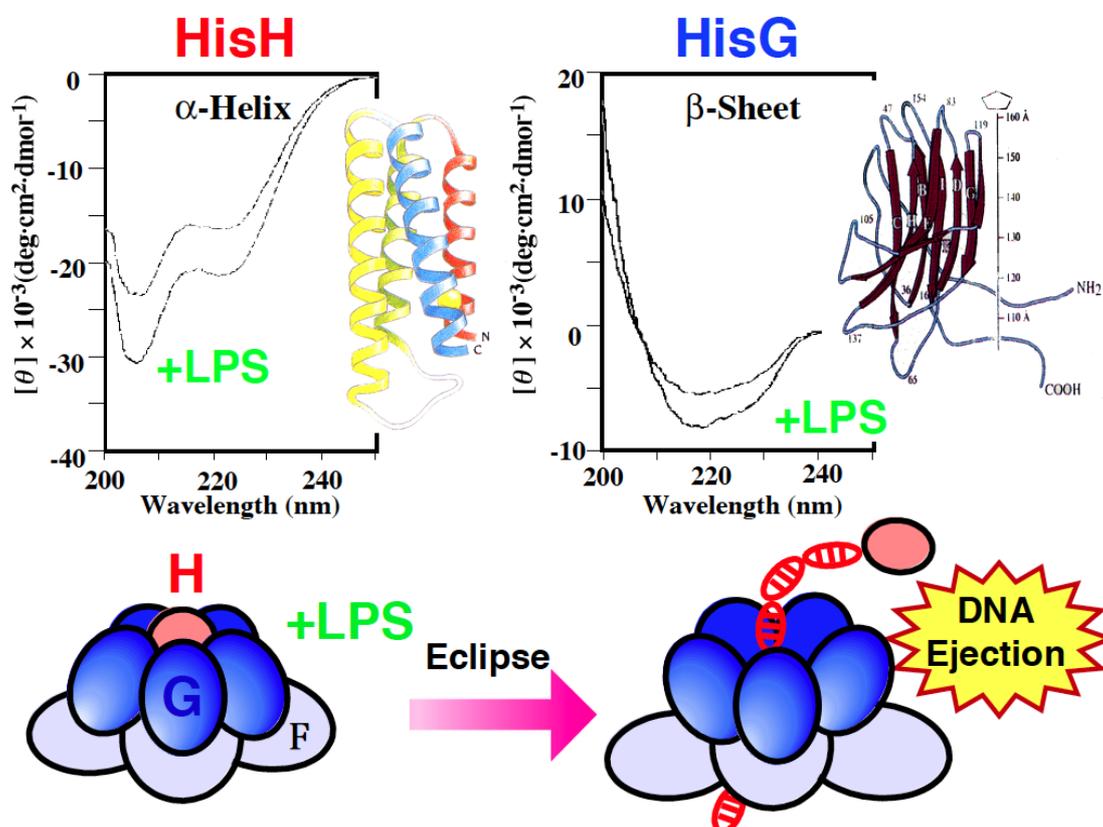
$$H (7.1 \mu\text{M}) / G (0.35 \mu\text{M}) = 20.3$$

∴ GはHより約20倍強く結合する！



18 スパイクタンパク質はLPSと結合して立体構造が変わる  
円偏光2色性スペクトルは、タンパク質の二次構造を観測することができます。H タンパク

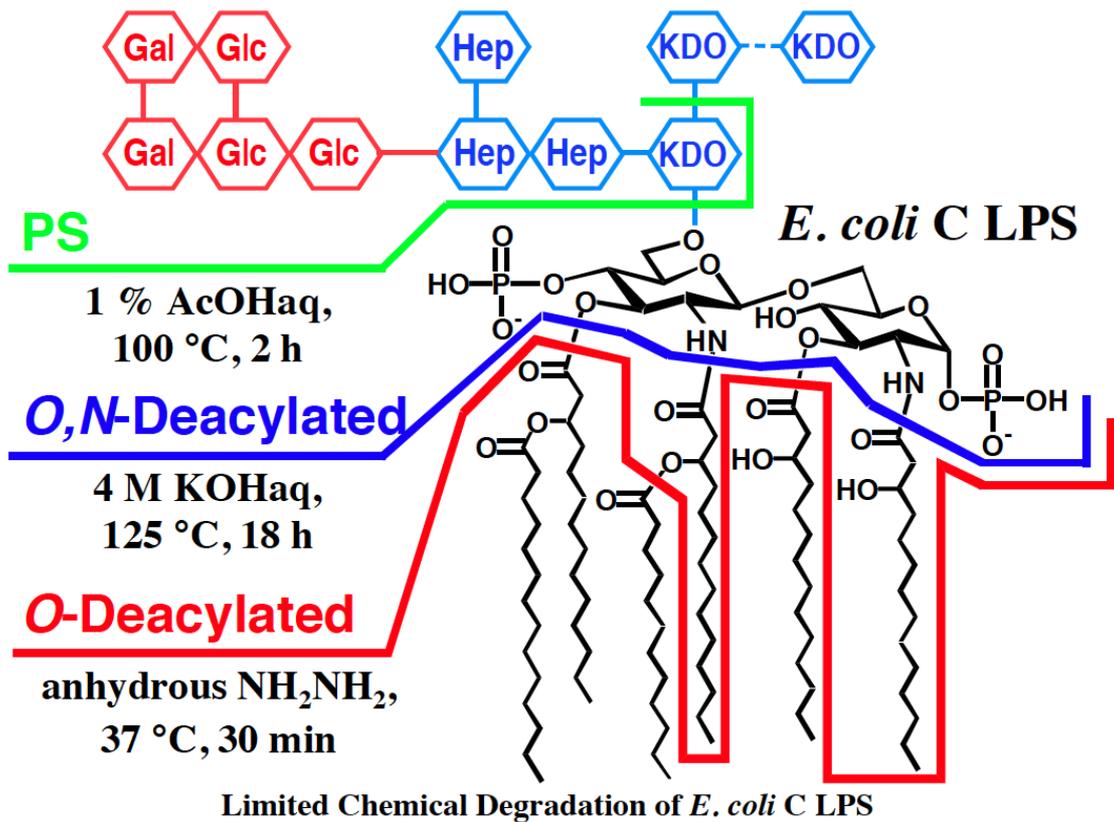
質は、 $\alpha$ ヘリックス構造(208 と 222nm に極大吸収)を多く含む信号を示し、一方 G タンパク質は、 $\beta$ シート構造(217nm に負の極大吸収)に富む信号を示しました。そこへ LPS を添加すると、それぞれの構造に特徴的な信号が著しく増大することが判りました。これはタンパク質の立体構造が変化した証拠で、LPS と結合すると形が変わる、つまりこれが遺伝子を放出するためのエクリップス構造変化に対応するものと思われます。



#### 19,20 LPS を糖部分と脂質部分に分解してスパイクタンパク質との結合を調べる

LPS を化学的な処理で分解し、糖鎖の途中(緑線)で切断した PS 体や、脂質部分だけ(青線)を切り出した deON 体、および脂質の部分を少し残す(赤線)場所で分解した deO 体を作り、スパイクタンパク質との結合を調べました。

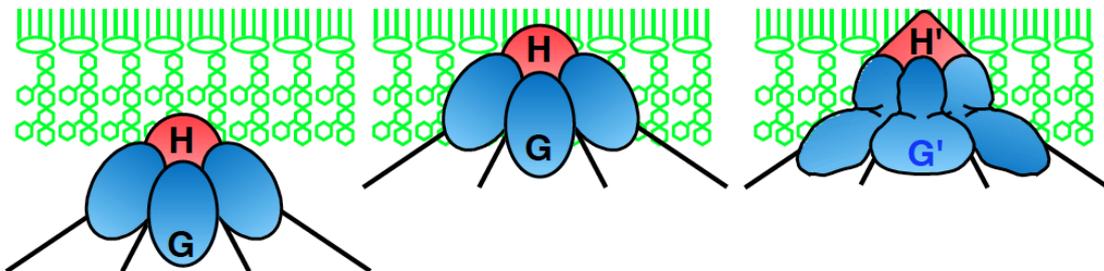
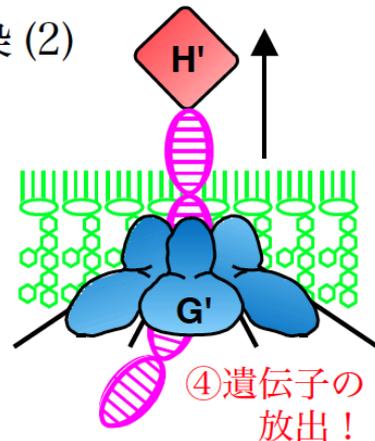
すると 20 図の様に、H タンパク質は、糖だけにはあまり結合せず、立体構造が変化しなくなりました。一方、G タンパク質は、脂質部分を切断しても、糖鎖部分と結合して立体構造を変えることが判りました。このことから、H は、LPS の脂質部分を良く認識すること、G タンパク質は糖鎖部分を良く認識すると予想しました。



### φX174ウイルスの感染 (2)

表 タンパク質とリポ多糖の結合実験データ

タンパク質		多糖だけ	多糖+油
<b>H</b> 	結合する	△	○
	形が変わる	×	◎
<b>G</b> 	結合する	○	◎
	形が変わる	◎	◎



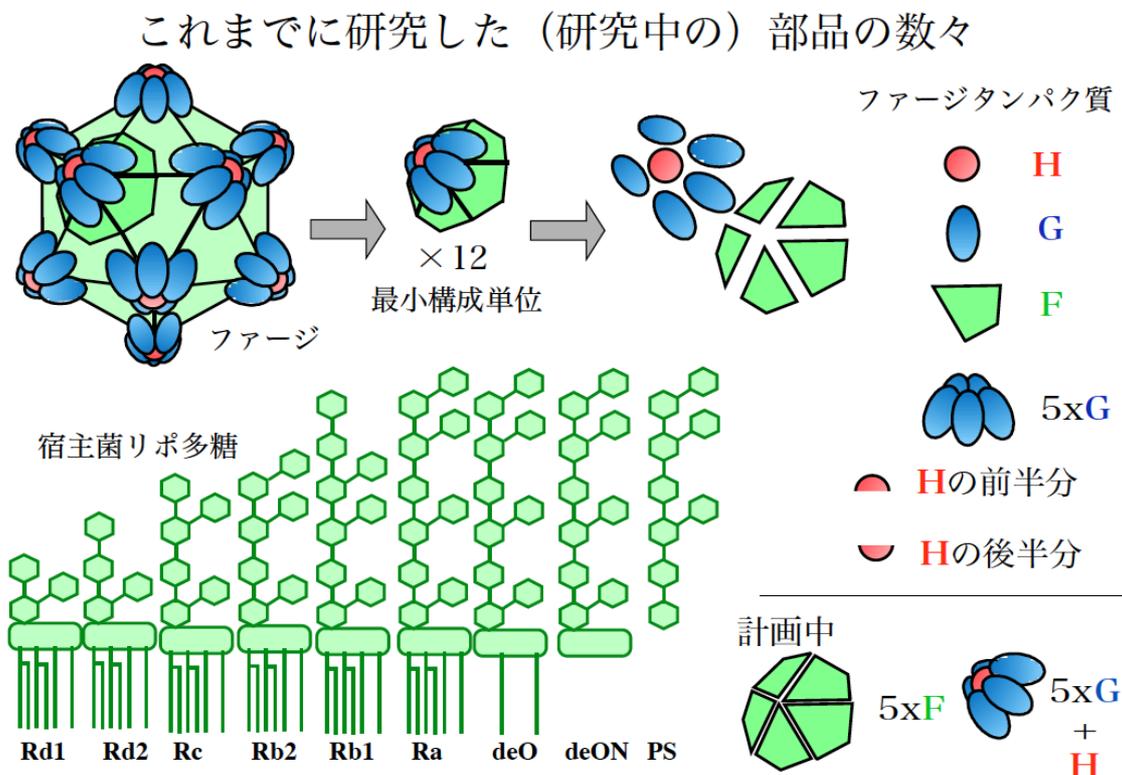
- ① **H**がリポ多糖の糖と結合する
- ② より深く突き刺さり **H**が油の層に届く。
- ③ **H**が油、**G**が糖と結合して形が変わる。

## 21 これまでに行った大腸菌 LPS とファージを部品に分解して調べる研究

これまでに大腸菌の表面から LPS を取り出して実験に用いてきました。大腸菌やサルモネラ菌には、糖鎖の短い LPS を作る菌がいるため、それらの短い糖鎖の LPS も調べました。すると、糖鎖が完全に保存された Ra 型 LPS にもっとも良くスパイクタンパク質が結合することが判り、宿主選択性を説明することができました。また LPS を化学的に分解して調べると、脂質部分と糖鎖部分の内、H は、脂質を G は糖鎖をより強く認識すると予想されました。

さらに研究を進めて、G タンパク質が 5 つ並んで 5 量体を作り、スパイク突起に含まれる形のタンパク質をつくることに成功し、これは単量体よりも 100 倍ほど、LPS との結合が強いことが判りました。また、F タンパク質を遺伝子組み換えにより調製して調べると、G より弱いものの H と同程度に LPS と結合することが判りました。

これからも複雑なタンパク質や糖脂質をどんどん有機化学的な分子として説明できる大きさの部品にまで分解して研究していく立場と、分解した部品を再び少し筒組み立てて調べることで、組み立てられることの理由や効果を明らかにする立場の両面からファージの宿主認識を研究していこうと思います。



## 22 新しいアプローチ 非天然の糖鎖構造，同位体安定化糖鎖の作製

大腸菌やサルモネラ菌の外部コア糖鎖が保存された Ra 型の菌株は、 $\phi$ X174 によりよく認識されて良好な宿主菌となります。しかし、糖鎖の長さは同じでも、そこに含まれる残基の種類や結合様式は様々で、そうであっても感染できる点が不思議です。

大腸菌 C 株では、外部コア糖鎖の非還元末端は、ガラクトース Gal であり、サルモネラ菌や大腸菌 F576 株では、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)です。一方、大腸菌 K-12 株では、非還元末端に特殊な 7 炭糖の L-グリセロ-D-マンノ-ヘプトース(Hep)が結合しています。単純に見れば、この Hep 残基が邪魔なため  $\phi$ X174 が感染できない様に見えます。それを支持する例として、大腸菌 K-12 と R2 型の F576 株との相違点は、この一残基が Hep か GlcNAc かの違いだけです。そこでこの Hep に注目して研究を進めたい所ですが、もう天然の LPS を取ってくるだけでは目的を達することができません。そこで、菌株の LPS 生合成遺伝子を改変する必要があ

ると考えました。

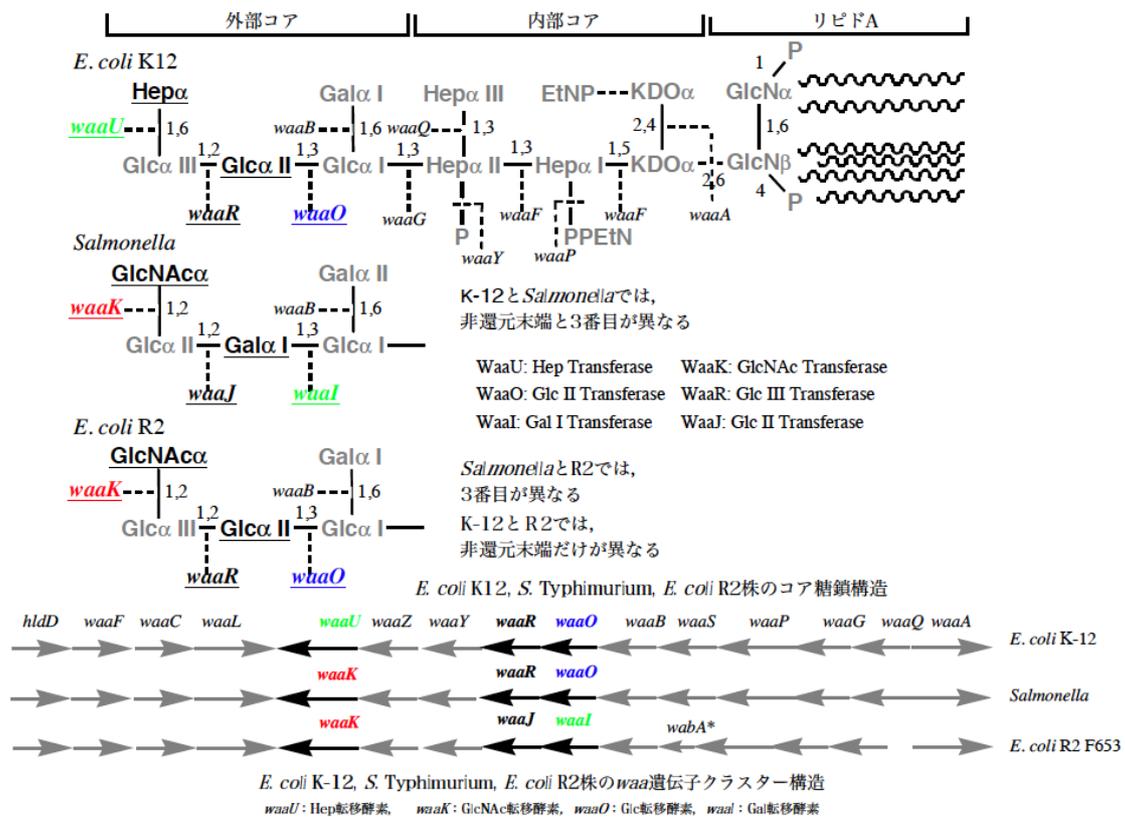
*E. coli* K-12だけはRa型糖鎖であっても感染できないのはなぜか？

Strain	Outer Core	Inner Core	Lipid A
<i>E. coli</i> C (Ra) ◎	Gal   Gal-Glc	Glc   Glc-Hep	Hep   Hep-KDOs-Lipid A
<i>S. Typhimurium</i> TV119 (Ra) ◎	GlcNAc   Glc-Gal	Gal   Glc-Hep	Hep   Hep-KDOs-Lipid A
<i>S. Typhimurium</i> SL733 (Rb1) ○		Gal   Glc-Gal	Hep   Hep-KDOs-Lipid A
<i>E. coli</i> R2 F576 (Ra) ○	GlcNAc   Glc-Glc	Gal   Glc-Hep	Hep   Hep-KDOs-Lipid A
<i>E. coli</i> K-12 W3110 (Ra) ×		Hep   Glc-Glc	Hep   Hep-KDOs-Lipid A

### 23 LPS 生合成遺伝子クラスター *waa* を組み替える

グラム陰性菌の LPS は、菌のゲノムの *waa* 遺伝子クラスターと呼ばれる一連の酵素の組み合わせで、多彩な糖鎖が作り分けられています。22 図で説明した菌の *waa* 遺伝子群は、GlcNAc 残基を転移する *waaK* 遺伝子を持つサルモネラと F576 株に対して、Hep 残基を転移する *waaU* 遺伝子を持つ K-12 では遺伝子が丁度入れ替わった形になっています。

それならば、ここを入れ替えれば、我々の研究に好都合な糖鎖を持つ LPS を作る菌に改変することができるはずで。そこで、次にゲノムの遺伝子を入れ替えて、人為的に糖鎖の配列を改変しようと言う段階に進む計画を立てました。

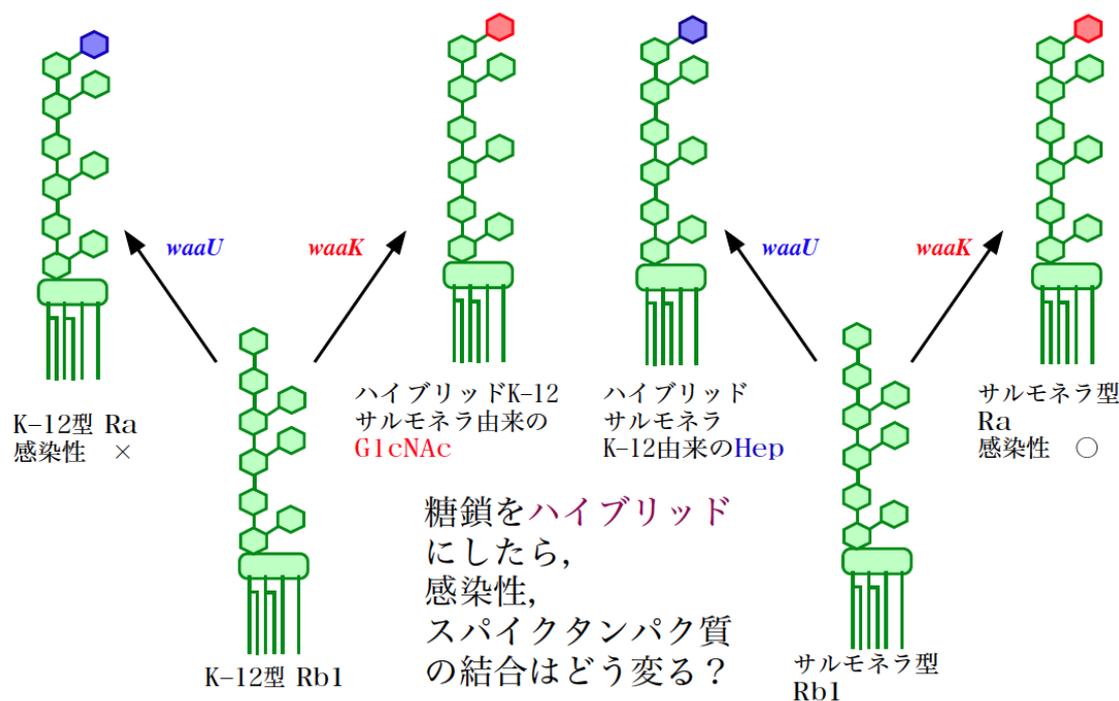


## 大腸菌リポ多糖のR-コア糖鎖生合成に関わる遺伝子とwaa遺伝子クラスター

### 24 非天然型糖鎖を持つ大腸菌 K-12 株やサルモネラ菌を作製する

大腸菌 K-12 株のゲノムから Hep を転移する *waaU* 遺伝子をクローニングし、サルモネラ菌を形質転換すれば、K-12 の非還元末端の糖鎖が  $\phi$  X174 フェージの感染に不都合な Hep 残基に替わるはずですが、一方、サルモネラ菌のゲノムから GlcNAc を転移する *waaK* 遺伝子を取り出して大腸菌 K-12 株を形質転換すれば、今度は、感染に好都合な GlcNAc 残基が取り込まれるはずですが、そうした非天然の糖鎖を持つ LPS を作る菌株に、フェージ  $\phi$  X174 は感染できるのでしょうか？できないのでしょうか？これらを実験で明らかにすることによって、Hep と GlcNAc の違いなにもたらすのか？確かめたいと思います。

## 遺伝子を組み換えて人為的に非天然の糖鎖を作らせる



### まとめ

ファージは、大変基礎的でありながら、多くの生命現象の縮図であり、いま尚、研究の価値を失っていません。かつて mRNA の存在はファージの研究から明らかになったことです。特定の細胞を選択し、その細胞に自分の意図する遺伝子を注入して細胞を乗っ取り、目的のタンパク質の生産と遺伝子の複製を成しとげ、そこから脱出して生活環をつなぐウイルスは、まさに、がん細胞や病んだ細胞に狙い撃ちで遺伝子を打ち込み、遺伝子の働きを誘発して駆除したり治療したり、と言うまさに私たちが夢みていることをすでに実現していると見ることができます。これを研究しない理由はありません。

研究には、有機化学、生化学、遺伝子工学、物理化学の手法や知識を駆使せねばなりません。あくまで考え方の基本は、有機化学にあるとしても、種々の方法を理解して広い分野に積極的に取り組む必要があります。

例えば、近い目標である、非天然型の糖鎖を作る菌株が無事出来たととしても、まず、微生物学の手法で菌を培養して増やし、生化学の手法で LPS を抽出、有機化学的あるいは、物理化学的にクロマトグラフィーや遠心分離、透析、電気泳動を行って精製せねばなりません。精製した LPS は、化学的反応で部分分解し、高速液体クロマトグラフィーや質量分析、核磁気共鳴法を用いて構造を決定せねばなりません。そこで初めての希望通りの糖鎖を作ることを証明することができる訳です。

さらに、生化学の方法で、スパイクタンパク質を発現させ、タンパク質を単離精製し、電気泳動で確認します。得られたタンパク質と LPS が結合する様子を蛍光分光スペクトル、円偏光二色性スペクトル、表面プラズモン共鳴(BIACORE)などを使って測定します。

そして、数学モデルにそって、分子間の相互作用を解析し、結合定数や自由エネルギー変化を決定します。などなど、極めて広い範囲の理化学的方法を使いますので、測定や反応の原理を理解して使いこなすために、なかなか労力と根気が必要です。

卒業論文に取り組む学生は、ぜひ根気とチャレンジ精神、広い理化学の海原にこぎ出す勇気(有機)を持っている必要があります。そんな学生を待っています。