

バクテリオファージ φ X174の宿主認識機構

誌名	三重大学生物資源学部紀要 = The bulletin of the Faculty of Bioresources, Mie University
ISSN	09150471
著者名	稲垣, 穰 川浦, 知子 西川, 司朗 柏村, 直樹
発行元	三重大学生物資源学部
巻/号	27号
巻号補足	
掲載ページ	p. 17-40
発行年月	2001年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



バクテリオファージ ϕ X 174 の宿主認識機構

稲垣 穰・川浦知子・西川司朗・柏村直樹

三重大学生物資源学部・生物圏生命科学科*

Host Recognition Mechanism of Bacteriophage ϕ X174

Minoru INAGAKI, Tomoko KAWAURA, Shiro NISHIKAWA, and Naoki KASHIMURA

Department of Life Science, Faculty of Bioresources, Mie University, 1515 Kamihama, Tsu, Mie 514-8507.

Abstract

Bacteriophage ϕ X174 is a small icosahedral virus 26 nm in diameter and one of the simplest viruses having a single-stranded circular DNA and four capsid proteins. It is also one of the most well studied viruses, however, there are many unknowns, in particular, about the mechanism for the recognition of host bacteria. This review discusses the mechanism for host-recognition by summarizing the studies on: 1) structure and morphogenesis of ϕ X174; 2) the three distinct steps in phage infection; 3) structure and function of lipopolysaccharides as phage receptor; 4) role of capsid proteins on host-recognition; and 5) interaction of spike proteins with receptor lipopolysaccharides.

Key words: bacteriophage ϕ X174 • phage receptor • lipopolysaccharide • host-recognition • infection

はじめに

ウイルス研究の始まりは、1899 年オランダの BEIJERINCK によるタバコモザイクウイルスの発見や 1916 年イギリスの TWORT あるいは、1917 年カナダの d'HERELLE によるバクテリオファージの発見に遡ることができる^{1,2)}。それら初期のウイルス研究から端を発して、現在はインフルエンザ、ヘルペス、エイズ、エボラなど人類に直接危害をおよぼす難病ウイルスに対する研究が進められている。また、ウイルスの範疇に留まらず、植物や動物の遺伝子の解読や遺伝子からタンパク質への翻訳とそれによって生み出されるタンパク質の機能の研究など華々しい分子生物学の分野が発展している³⁾。こ

れらのすべての基礎は ϕ X174 や T4 といったバクテリオファージに関する研究が基になったと言っても良い。なぜならば、最も単純な単細胞生物であるバクテリアとそれに感染するウイルスであるバクテリオファージが、分子生物学の出発段階として足がかりになったからである。とくに ϕ X174 や T4 の増殖と複製に関する研究は、ファージ自身のみならず宿主側の大腸菌の DNA の複製・増幅や翻訳に関する機構の解明に大いに貢献し、例えばメッセンジャー RNA の発見をもたらした³⁾。また、 ϕ X174 は放射線や活性酸素による遺伝子 DNA の損傷機構の研究にも用いられた⁴⁻⁶⁾。つまり ϕ X174 を含むバクテリオファージは生命の基本的なモデルとして研究され、それが生化学、分子生物学の基礎を作っていた訳

である。この話題に関しては、HAYASHI⁷⁾ や KOMANO⁸⁾, UEDA⁹⁾ による総説が詳しい。

抗生物質の発見によって我々人間は細菌との戦いに勝利し、細菌感染症から解放されたと言われたが、ウイルスとの戦いには未だに決定打のない状態が続いている。ウイルスの中で最も研究の進んだバクテリオファージに関してさえも全てが判ったとは到底言えない状況である。さらに近年には、抗生物質の使いすぎによる耐性菌の出現が我々を脅かすようになった。単純なファージが宿主となる細菌だけを選び出して感染しそして殺す、と言う複雑な作業をいともたやすくやっつける。全ての細菌に対してそれぞれ感染するファージがいると言われており、さらにファージの宿主細菌に対する選択性は時に厳密で、時に幅広く自由自在である。そこで、各種の感染スペクトルを持ったファージを用意し、それらが感染するかどうかのパターンによって細菌を細かく分類する、ファージ型別と言う手法が発達している¹⁰⁻¹²⁾。ファージ型別によれば、抗原抗体反応やゲノムの塩基配列の解析では区別できない細菌を区別できる場合があり、特にサルモネラ食中毒の原因菌を分類するのに役立っている^{13, 14)}。しかし、それぞれのファージがどのようにして細菌を区別するかについての分子レベルでの解明は、まだ全く行われていないのが現状である。この様なファージのやり方を詳しく研究することによって、我々人間が

ある特定の病原菌を検出したり、それを撃退する新しい治療方法を見いだせるかも知れない。

BRADLEY によるバクテリオファージの形態分類では、全てのファージは A から F の大きく 6 つのグループに分類される (Fig. 1)¹⁵⁾。A 型は、収縮性の尾鞘を持つ大型ファージで、T2, T4, T6 など T 偶数系ファージが含まれる。B 型は長い尾を持つ大型ファージで、T1, T5, λ などが含まれる。C 型には短い尾を持つ中型ファージである T3 や T7 などの大腸菌ファージや ϕ ¹⁵⁾, P22 などのサルモネラ菌ファージが含まれる。D 型は、スパイクを持つ正 20 面体型ファージで、これから述べる ϕ X174 の仲間であられる。E 型は RNA を遺伝情報を持つ小型正 20 面体型ファージで、 ϕ 2, R17, Q β などが、また F 型の繊維状のファージには、一本鎖環状 DNA を持つ ϕ d や M13 が含まれる¹⁶⁾。

バクテリオファージ ϕ X174 は 1959 年に SINSHEIMER によって初めて単離されたファージ^{17, 18)}であり、T4 ファージ¹⁹⁾と並んで最も古くから研究されたファージのひとつである。 ϕ X174 はミクロウイルス科 (*Microviridae*) に分類され、直径約 26 nm の正 20 面体型である (Fig. 2A)²⁰⁾。遺伝情報として 5386 塩基の環状一本鎖 DNA を持ち、全ゲノムの塩基配列が解読された最初の有機体でもある²¹⁻²⁴⁾。遺伝子は全部で 11 個あり、A, B, C, D, E, F, G, H, J の 9 つの必須遺伝子とその他 A* と K

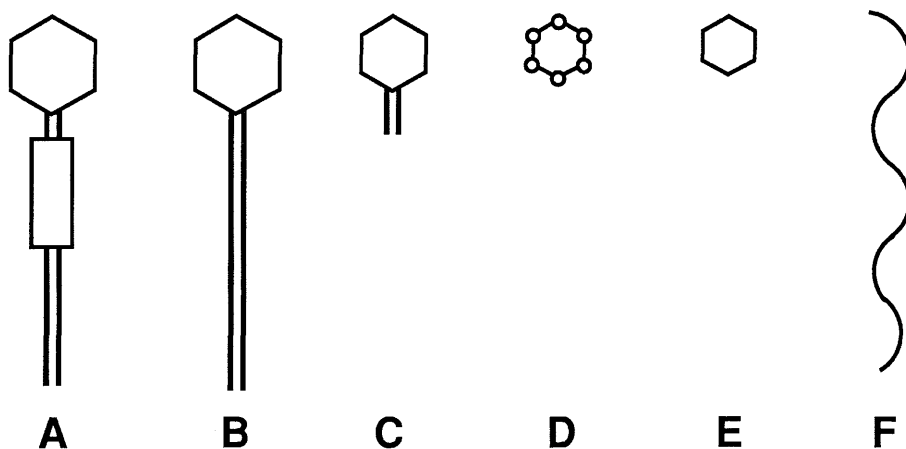


Fig. 1 Bradley's morphological classification of bacteriophages.¹⁵⁾

A: having a tail with a contractile sheath, B: having a long tail, C: having a short tail, D: having spikes on icosahedral vertices, E: small icosahedral, F: long flexible filament,

遺伝子が存在する (Fig. 2B)^{7, 25, 26)}。そのうち, F, G, H, J の4つの遺伝子はファージの外側の殻 (カプシド) を構成するタンパク質をコードしており, この4つの遺伝子で全ゲノムの半分強を占める。その他の遺伝子はファージ DNA の複製のためのタンパク質 (A, A*) や二本鎖 DNA を一本鎖に変えるためのタンパク質 (C), ファージを組み立てる過程に関わるタンパク質 (B, D), またファージの増殖に必須ではないが増殖を促進するタンパク質 (K) や増殖したファージが菌体を溶かして出るための溶菌因子 (E) をコードしている⁷⁾。

φX174 は, DNA を遺伝子に持つバクテリオファージの内では最も小さく単純である。例えば, A 型に属する T4 ファージのゲノムは約 17 万塩基対の二本鎖 DNA で, 遺伝子の数は優に 150 を越える³⁾。このことから φX174 の遺伝子がいかに少ないかが判る。しかし, 遺伝子の数の割には全体が小さいことも φX174 の特徴である。その秘密は1つの塩基配列が複数の読み方をされて複数のタンパク質が造られることにある (Fig. 2B)⁷⁾。A* 遺伝子は A 遺伝子の内部に含まれ, A 遺伝子の途中から翻訳が始まる短い読み枠の遺伝子である。また, トリプレットの読み枠をずらして複数の遺伝子が重なってコードされている領域もある。B と K 遺伝子は, A から C 遺伝子に渡る領域の中にあり, E 遺伝子は D 遺伝子の中にある。

これまでに φX174 の同族ファージが 15 種類以上も

同定されている²⁷⁾。それらに共通の特徴は, 小さな正 20 面体型カプシドに約 5500 塩基の環状一本鎖 DNA が含まれていることである。これらの同族ファージは下水や土壌中など大腸菌やサルモネラ菌が生息する場所から普遍的に見いだされる。これまでに同定されたファージが 15 種類あるに過ぎず, まだ未同定の極めて多数のファージが存在すると考えられており, バクテリオファージの中で数としてかなり大きなグループを形成している。

このように φX174 は, 最もありふれたファージであり, また最も研究の進んだファージの一つでもあるが, 判らないことはまだまだ多い。とくに宿主細菌に対する感染メカニズムはいまだに謎の点が多い。本総説は感染の初期にどの様に宿主認識が行われているかに関する研究に焦点をあてて紹介する。まず初めに φX174 ファージ粒子の構造と感染初期過程について述べ, 次に感染の段階におけるレセプター分子であるリボ多糖の構造と感染の選択性との相関について述べる。最後にファージの宿主認識における構造タンパク質の役割について, 著者らの最近の研究も含めて考察する。

1. φX174 の構造

1-1. 4つの構造タンパク質

ファージの研究初期の電子顕微鏡による観察で, φX174 は直径約 26 nm の極めて小さな正 20 面体型をし

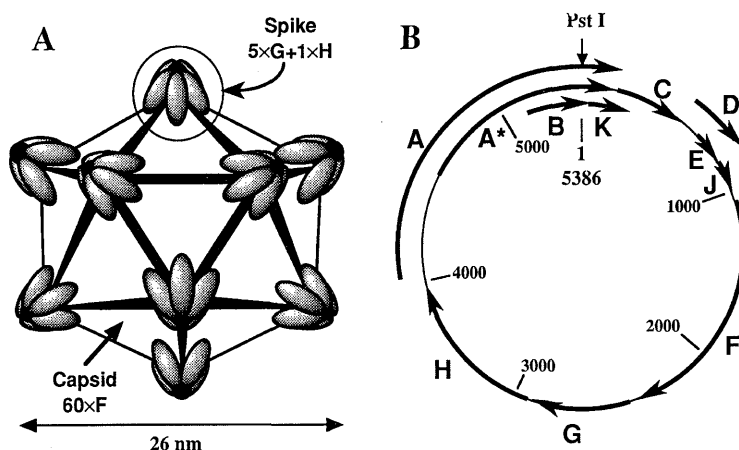


Fig. 2 Schematic structure of φX174 particle (A) and genetic map of single-stranded DNA of φX174 (B).⁷⁾

ており、そして20面体の12カ所の頂点にスパイクと呼ばれる突起を持っていることが判った^{20, 28)}。φX174を構成するタンパク質は、F, G, H, Jの4種類であり、F, G, Jは1つのファージ粒子(ビリオン)に60分子、Hは12分子含まれる²⁹⁻³¹⁾。それぞれの構造タンパク質の分子量と機能をTable 1にまとめる。

φX174を構成するタンパク質の中で、分子量が大きく数も多いFタンパク質(48 kDa)と、分子量がやや小さいが60分子含まれるGタンパク質(19 kDa)が最初に同定され³²⁾、続いて12分子含まれるHタンパク質(34 kDa)が同定された³³⁾。SINSHEIMERらのグループは、ファージ粒子を4Mの尿素で温和に処理すると、20面体のカプシド骨格とスパイク部分に分離することを見出し、20面体の骨格をFタンパクが構成し、スパイクはHタンパク質1分子とGタンパク質5分子で構成されることを明らかにした²⁹⁾。1つのファージ粒子に60分子含まれ、最も分子量の小さいJタンパク質が一番最後に見つかった³¹⁾。そしてJ遺伝子の存在は、まずカプシドから得られたJタンパク質のアミノ酸配列が決定され、その配列に対応する塩基配列を遺伝子上で検索することによって同定された³⁴⁾。37残基中に6つのリジン残基と6つのアルギニン残基を含む非常に塩基性アミノ酸に富むJタンパク質は、ファージ粒子の中で一本鎖DNAと結合してDNA鎖を折り畳むパッキングを司っている³⁵⁻³⁷⁾。

1990年から1994年にかけて、ファージ粒子全体のX線構造解析が遂に行われ、F, G, Jの三つのタンパク質について立体構造が解明された³⁸⁻⁴⁰⁾。20面体カプシドは基本的に60分子のFタンパク質のみで形成されている。個々のFタンパク質は、8本の逆平行βシート構造を中心に幾つかのαヘリックスがそれをつなぐ構造を持っており、それが5分子集合したβバレルモチーフが12個集合して最も小さい正20面体(T=1)を形成してい

る。このモチーフの構造はバクテリオファージに限らず、動物や植物の正20面体ウイルスに共通の構造である。Fカプシドの内側のDNA結合空洞の表面には、S字形をした1分子のJタンパク質が2分子のFタンパク質に跨るように結合しており、さらにJタンパク質は一本鎖DNAと結合している。Gタンパク質も8本の逆平行βシート構造が基本にあり、Fタンパク質のαヘリックス部分を取り除いて小さくしたような形である。その5量体が形成するスパイクはマッシュルームのような円錐台で、Fタンパク質のカプシドとはほんの少しか接しておらず、浮き上がったように乗っていることが判った。しかし、4つめの構造タンパク質であるHタンパク質は、FとGタンパク質5量体を作る親水性のチャンネルの内に弱い電子密度としてしか観察されなかったため、その存在位置が確認できていない。Hタンパク質の電子密度がFやGタンパク質に比較して1/5程度しかないことから、FANEとROSSMANNらはHタンパク質はFやGタンパク質と相互作用する面を1つだけ持っており、チャンネルのどれか1つの面に寄り掛かって5通りの配向を取ると予想している⁴¹⁾。しかし、チャンネル内部は15-20残基のアミノ酸を収納できる程度の広さしかない。Hタンパク質は全長で328残基もあるため、ほんの一部しか入ることができず、その他の大部分はチャンネルの更に内部に押し込まれているか、あるいは外部に向かって飛び出していると考えざるを得ない。

X線構造解析以外にもファージの構造を調べた研究がある。電子顕微鏡による観察の際に重金属を使ったネガティブ染色や蒸着による影付けを行わず、ガラス状の水で凍結したファージ粒子を直接観察する、凍結電子顕微鏡解析である^{42, 43)}。得られた電子回折パターンをコンピュータ処理して画像を構築する方法で、原理的にはX線構造解析とよく似た方法である⁴²⁾。この方法では三次元的な分子の表面を示すため、いわゆる外観の姿を見

Table 1. Capsid proteins of φX174. ⁷⁾

Capsid protein	Copy	MW. (kDa)	Function
F	60	48.4	capsid backbone
G	60	19.0	major spike
H	12	34.4	minor spike
J	60	4.2	SS-DNA packaging

ることが可能であり、この方法で可視化された φX174 粒子は、まるで金平糖の様なゴツゴツした姿をしており、正 20 面体の各頂点にあるスパイクがかなり大きく出っ張った厳つい姿をしている⁴³⁾。

1-2. φX174 の形態形成

感染細胞の中で φX174 粒子が組み立てられる“形態形成”の過程については、多くの研究が積み重ねられてきた⁴⁴⁾。これまでの研究を参考に形態形成の概要を Fig. 3 に示す。ファージ粒子の組立は、まず F と G タンパク質が自発的に集合して 9S と 6S の沈降係数を持つ 5 量体が生成することから始まる⁴⁵⁾。つぎに、5 量体同士が足場タンパク質 B の助けを借りて集合し、正 20 面体の重要な構成単位となる 12S 粒子ができる。さらに、12S 粒子に H タンパク質ともう一つの足場タンパク質 D が組み込まれて生じる単位が 12 個集合して、正 20 面体型をした 108S 前駆体（プロヘッド）が生成する^{46, 47)}。そして、ファージの複製型 DNA (RF-DNA) が一本鎖 DNA (SS-DNA) に解けつつ J タンパク質を伴って折り畳まれ、プロヘッドに取り込まれる⁴⁸⁾。ここから B タンパク質が脱離すると 132S 粒子が生成する。132S 粒子はまだ足場タンパク D を含む未完成な粒子だが、宿主細菌に感染することができる⁴⁹⁾。最後に 132S 粒子から D タンパク質が脱離すると、成熟したファージである 114S 粒子ができて上がる。この時タンパク質 B と D は、ファージが組み立てられる際に一旦組み込ま

れ、その後抜けていくことから足場タンパク質と呼ばれ、形態形成を正しく進めるために必須である⁵⁰⁾。また近年には、足場タンパク質を含むプロヘッドの X 線構造解析^{41, 51)} や凍結電子顕微鏡解析⁵²⁾ が行われ、足場タンパク質の詳細な役割が次々に明らかにされた⁵³⁻⁵⁵⁾。D タンパク質は 1 分子の F タンパク質に 4 分子ずつ結合しており、プロヘッド全体で 240 分子も含まれる。スパイクの突起と突起の間の窪みを D タンパク質が埋め尽くしており、プロヘッドはほぼ球形である。1972 年に BAYER らは、電子顕微鏡によってファージ粒子のネガティブ染色像を捕らえた研究の中で、溶菌して菌体から外へ出たファージ粒子はスパイクの突起が綺麗に見えるが、菌体の内部にある粒子はスパイクが不明瞭で球形に見えると報告している⁵⁶⁾。これは成熟した 114S 粒子とプロヘッドを観察したものと考えられる。

2. ファージ感染の三段階

φX174 の感染初期過程には、区別して観測できる三つの段階がある⁵⁷⁾。吸着とエキリプスさらに DNA 挿入の三段階である (Fig. 4)。初めにファージ粒子は宿主菌体と出会い可逆的に結合した状態を取る。これは吸着と呼ばれる。つぎに粒子は菌体表面にさらに強く結合してカプシドの高次構造変化を起こす^{57, 58)}。この変化をエキリプスと言い、一本鎖 DNA の一部が飛び出した状態になる。この段階での高次構造の変化は不可逆的である。

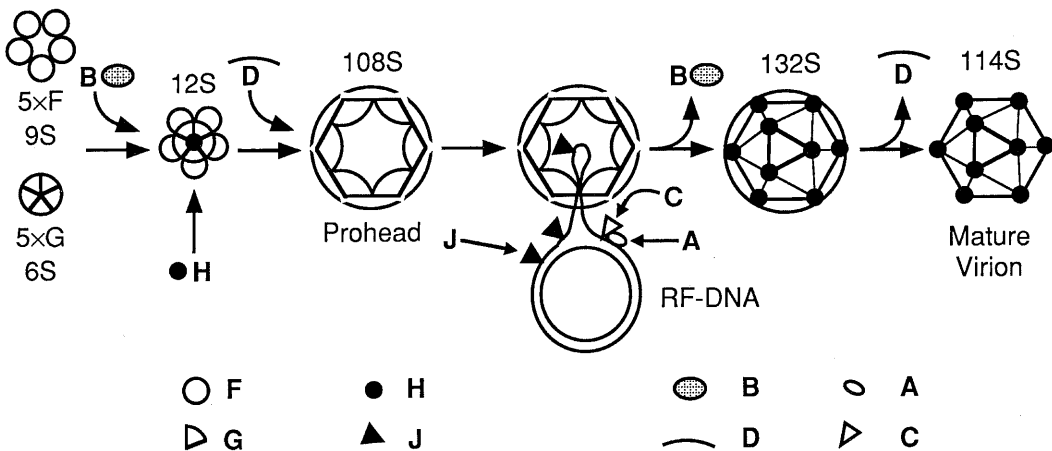


Fig. 3 Morphogenetic pathway of φX174. ⁴⁴⁻⁴⁵⁾

さらに、エキリプスで飛び出した DNA が菌体内に挿入される段階を DNA 挿入と呼ぶ。

インタクトなファージ粒子の沈降係数は 114S であるのに対して、エキリプスした粒子は 86S でより小さな値を持つ。エキリプス粒子の沈降係数はエキリプスを誘導する際の処理時間と多重感染度 (moi) によって 60-90S まで変化することが判っている。エキリプス粒子ではファージの DNA がヌクレアーゼによる攻撃を受けるようになることから、少なくとも一部の DNA がカプシドから飛び出した状態であり、飛び出した DNA が抵抗になって沈降が妨げられると解釈された⁵⁷⁾。DNA を放出した空の粒子はエキリプス粒子よりさらに強く菌体表面に固着しているが、細胞を EDTA を含むホウ酸緩衝液で処理すると剥がすことができる。空の粒子は 72S の沈降係数を持っており、エキリプス粒子に較べて DNA が含まれない分軽くなっている⁵⁷⁾。BAYER らは、 ϕ X174 に感染した宿主菌を高張液に移して原形質分離させ、超薄切片を作って電子顕微鏡で観察すると、外膜と内膜が接合しているジャンクションと呼ばれる箇所が 1 つの細胞あたり数百カ所認められ、そのようなジャンクション付近に ϕ X174 の空の粒子が集中して結合していることを発見した⁵⁸⁾。他にも T1 から T7 までの T 系ファージ⁵⁹⁾ や K29 ファージ⁶⁰⁾ においても、ジャンクション付近に選択的に結合して DNA を注入しているファージの姿が電子顕微鏡で捉えられている。ジャンクションは細菌の細胞質内で生合成されたり多糖 (lipopolysaccharide, LPS)

や膜タンパク質などの外膜の構成成分が表面に運ばれて出てくる場所であり⁶¹⁾、ファージはこうした場所を探して DNA を注入すると考えられる。ファージ粒子が宿主菌表面のどこかに吸着した後にジャンクション付近に移動するのか、初めからジャンクション付近に吸着するのかは判っていないが、今のところ吸着後に菌表面を移動すると考えられている。DNA 挿入の段階では ϕ X174 粒子から放出された一本鎖 DNA は内膜を通して細胞質にまで運ばれる。この段階には宿主細胞が活動していることが必須で、何らかのエネルギーが必要であると予想されている⁶²⁾。細胞が活動していない場合には少なくとも外膜と内膜の間のペリプラズム空間までしか DNA が挿入されない。同様の現象が T4 ファージの DNA 透過においても確認されており、膜の静電的なポテンシャル (膜電位と水素イオン濃度勾配) の存在が必要とされている⁶³⁾。

ファージ感染の三段階に関して詳しい動力学を研究したデータがある。それによると、初めの吸着の段階の速度は極めて速く、事実上ファージの溶液中での拡散速度が律速である^{28, 56)}。可逆的な吸着は 15°C 以下の低温でも起こるが、エキリプスへの移行は低温 (4~15°C) では起こらず、37°C で起こる。証拠はないが、外膜に吸着した粒子が先程述べたジャンクションに運ばれるために、ある程度膜の流動性が必要なのかも知れない。したがって、ファージと宿主菌の吸着を低温で行わせ後に 37°C へ移すことで、エキリプスへの移行反応を同調させる

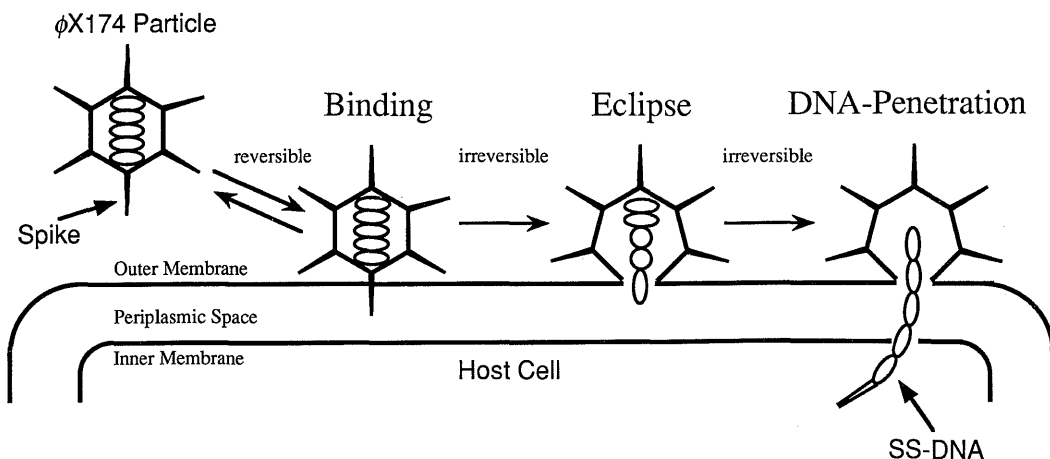


Fig. 4 Three distinct steps of ϕ X174 infection to host cell, ^{57, 58, 62)}

ことが可能である^{57, 64)}。そこで、エクリプスを起こすための必要条件や動力学を詳しく解析した、エクリプスキネティクスと呼ばれる一連の研究が行われた^{65, 66)}。その結果、エクリプスには宿主菌の膜画分に加えて1 mM程度の Ca^{2+} イオン⁶⁷⁻⁷⁰⁾や19°C以上の温度が必要であること⁷¹⁾、またエクリプス反応の活性化自由エネルギーは36 kcal/molと極めて大きいことが判った⁷¹⁻⁷³⁾。さらにINCARDONAは、ファージ粒子を宿主菌やその膜画分で処理しなくても、高濃度の Ca^{2+} (100 mM) を与えることでエクリプスに移行することを発見した⁶⁴⁾。そして、その際の反応の活性化自由エネルギーは、膜画分によってエクリプスが引き起こされる場合と同じ、36 kcal/molであることを示した。したがって、ファージ粒子が宿主菌と結合したり、あるいは Ca^{2+} と結合することによって高次構造が変化することがエクリプスへのスイッチになり、その段階の活性化自由エネルギーの獲得が反応の律速であると結論した。

3. ファージレセプターとしてのLPSの構造と機能

3-1. ファージレセプターとしてのLPS

φX174の研究の初期にあたる1960年代にはφX174ファージ粒子が Ca^{2+} イオンの存在下で宿主菌の外膜に吸着してエクリプスへ移行することが判っていたが⁶⁷⁾、外膜に含まれるどの成分がそれを引き起こすかは判っていなかった⁵⁷⁾。そこで、1973年から1975年にかけてINCARDONAら⁶⁸⁾やJAZWINSKIら⁷⁴⁾、あるいはNEUWALD⁷⁵⁾

は、粒子が吸着してエクリプスするために必要とする宿主細胞膜中の成分、つまり“レセプター”がLPSであることを相次いで証明した。LPSは大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性菌に特徴的に含まれる糖脂質である。グラム陰性菌は細胞膜（原形質膜）とそれを取り囲むペプチドグリカン層、さらにその外側に外膜と呼ばれる膜を持ち、三層の膜で覆われている⁷⁶⁾。グラム陰性菌は、グラム陽性菌に比較してペプチドグリカン層が薄く、また疎水的な外膜が親水性の色素を通さないためグラム染色されないことからこの名がある。外膜の脂質二重膜の内側葉は主にリン脂質で構成されているが、外側葉はほぼLPSによって形成されており、LPSは菌の生存に必須である。LPSはリピドA、R-コア糖鎖、およびO-抗原多糖に大きく分けられる三つの部分構造から構成されている^{77, 78)}。例として*Salmonella choleraesuis* serovar, Typhimurium (旧名*Salmonella typhimurium*, 以下S. Typhimuriumと書く)のLPSの構造をFig. 5に模式的に示す⁷⁹⁾。三つの部分構造は生合成的にも明確な区別があり、まずリピドA部分が生成され、そこからR-コア糖鎖が順番に延長され、最後にO-抗原多糖の繰り返し単位が転移されてLPSが作り上げられる⁸⁰⁾。φX174の宿主となる腸内細菌科のLPSでは、リピドA部分の構造はほぼ共通であるのに対して、R-コアとO-抗原多糖の構造は菌種により様々に異なっており、言わば細菌表面の“顔”として機能している⁸¹⁾。この顔が動物にとっては免疫応答の抗原になる他、バクテリオファージにとっては宿主を選択するためのレセプターになる。バクテリオファージの仲

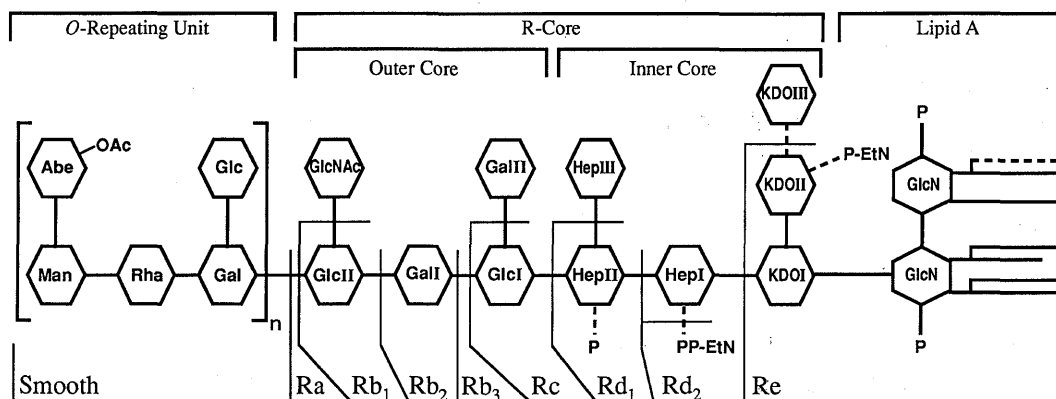


Fig. 5 Schematic structure of LPS of *Salmonella* Typhimurium. ^{79, 119)}

間では、LPS をレセプターとして認識するものが大多数を占めている。Fig. 1 に示したバクテリオファージの分類で、A, B, C, D 型に属するファージには LPS をレセプターとするものが多い。ただし、 ϕ X174 では LPS のみがレセプターであるが、T4 ファージの様にレセプターとして相応しい LPS がその菌にない場合には、外膜にある OmpC などのポーリンと呼ばれる物質取り込みのための膜タンパク質を“セカンドレセプター”として使用する仲間もいる⁸⁹⁾。また、E 型や F 型のファージは性線毛をレセプターとするファージで、線毛の中程や先端に付着し、線毛が菌体に収納される時に一緒に入り込み、感染する⁹⁰⁾。

つぎに、腸内細菌科の細菌の LPS 構造について見ていくことにする。リピド A は β -1-6 結合した D-グルコサミン (GlcN) の 2 糖に 4 分子の 3-ヒドロキシ脂肪酸が結合し、その水酸基にさらに 2 分子から 3 分子の長鎖脂肪酸が結合した物質である⁸³⁻⁸⁵⁾。LPS は、ヒトを含む哺乳動物に対して発熱、免疫活性化、細胞壊死、サイトカインの誘導など、多彩な生理活性を示す⁸⁶⁾が、リピド A は LPS の持つ生理活性を担う部分であり、脂肪酸の種類と置換パターンで生理活性が劇的に変化する⁸⁷⁾。リピド A に続く R-コア糖鎖はさらに内部コアと外部コアに分かれる⁸⁸⁾。内部コアは 2 から 3 残基の負荷電を持つ糖、3-デオキシ-D-manno-オクトロソニン酸 (KDO) と 3 残基の荷電を持たない糖、L-glycero-D-manno-ヘプトース (Hep) から構成される。また内部コアには数残基のリン酸 (P) やエチルアミノリン酸 (PEtN) が結合して正や負の荷電が散りばめられている。外部コアは D-グルコース (Glc), D-ガラクトース (Gal), D-グルコサミン (GlcN), N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc), などの電気的に中性なヘキソース 5 残基で構成されている。R-コア糖鎖はリピド A 側から順番に生合成されていくため、各段階の鍵酵素を欠損した変異株は、R-コアの生合成がそこで止まり、糖鎖の短い LPS を生産する。完全な R-コア糖鎖を Ra 型と呼び、そこから短くなるに従って、Rb, Rc, Rd 型となる。これらの化学表現系 (Chemotype) の記号と構造の対応は Fig. 5 に示す。そして、リピド A に 2 分子の KDO が結合した LPS を Re 型と呼び、これより糖鎖が短くなるとグラム陰性菌は生きて行けない。グラム陰性菌にとって LPS は外来物質の透過障壁になっており、LPS の糖鎖が短

い変異株は、抗生物質やリゾチーム、抗菌性色素に対して感受性が高くなる^{76, 89, 90)}。

R-コア糖鎖のさらに先には、4 糖から 6 糖くらいの繰返し単位が多数重合した長鎖の O-抗原多糖が結合している⁹¹⁾。この部分の繰返し単位の構造は極めて変化に富んでいるのが特徴で、D-マンノース (Man) や L-ラムノース (Rha) などの糖に加えて 3, 6-ジデオキシヘキソースであるアベコース (Abe), コリトース (Col) などの特殊な糖を含む。O-抗原多糖の構造は同じ菌種でも全く異なっている場合もある一方で、異なる菌種でも共通である場合もあり、これらの多彩な構造が哺乳動物に対する O-抗原性 (血清型) や病原性と深く関わっている⁹¹⁾。 ϕ X174 は O-抗原多糖を持たない R 型の腸内細菌に選択的に感染することから、本総説では O-抗原多糖の化学については詳しく述べず、ファージレセプターとして重要な R-コア糖鎖部分に議論を進めることにする。

大腸菌には現在までに 5 種類の R-コア糖鎖構造が確認されていて、*E. coli* R1~R4 および K-12 コアと呼ばれ、構造がそれぞれ異なっている。いっぽう、サルモネラ菌にはただ一つのコア構造のみが見つかっており、全てのサルモネラ菌で共通であると考えられている⁸⁸⁾。これまでに決定された R-コア構造を Fig. 6 にまとめた。R-コア糖鎖の構造は大変複雑であるため、これらの構造を精密に決定するためにはかなり長い年月を要した。それらの構造はほぼ明らかにされたが、未だに決定されていない箇所も存在する。したがって、Fig. 6 には 1970 年代から現在までの論文を調べて、最も妥当と思われる構造をまとめた^{88, 91-97)}。とくに、*E. coli* K-12 コアの構造が確定したのは、わずか 10 年前の 1991 年である⁹²⁾。また、*E. coli* R3 コアの構造が分岐ヘプトース (HepIII) の先に GlcN 残基が結合することも含めて、最終的に決定されたのは 1992 年である^{93, 94)}。さらに、*E. coli* R1 コアにおいても、1999 年になって、HepIII に GlcN 残基が部分的に結合していること、また *E. coli* R2 コアでは、外部コアの GlcII に β 結合した Gal 残基が微量含まれていることが判り、外部コアに 6 残基目のヘキソースを持つこれまでにない構造が見いだされた⁹⁵⁾。Fig. 5 や Fig. 6 の中で点線で描かれている結合は部分的に置換された残基を示す。三番目の KDO 残基 (KDOIII) やエタノールアミンを含むリン酸残基は、

Core Type ^{Li)}	Strain Name	Outer Core	Inner Core	Lipid A			
<i>Salmonella</i> ⁸⁸⁾	Typhimurium TV119	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc} \\ \alpha 1,2 \\ \text{Glc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Gal} \\ \alpha 1,6 \\ \text{Glc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Hep} \\ \alpha 1,7 \\ \text{Hep} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \\ \alpha 2,4 \\ \text{KDO} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^7\text{--PEtN} \\ \alpha 2,4 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^{2,6} \text{--Lipid A} \\ \alpha \end{array}$
				$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ \text{PPEtN} \end{array}$			
<i>E. coli</i> R1 ^{88,95)}	C F470	$\begin{array}{c} \text{Gal} \\ \alpha 1,2 \\ \text{Gal} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Glc} \\ \alpha 1,3 \\ \text{Glc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Hep} \\ \alpha 1,7 \\ \text{Hep} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{GlcN} \\ \alpha 1,7 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^{7?} \text{--PPEtN} \\ \alpha 2,4 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^{2,6} \text{--Lipid A} \\ \alpha \end{array}$
				$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ \text{PPEtN} \end{array}$			
<i>E. coli</i> R2 ^{88,95)}	EH100 F576	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc} \\ \alpha 1,2 \\ \text{Glc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Gal} \\ \alpha 1,3 \\ \text{Gal} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Hep} \\ \alpha 1,7 \\ \text{Hep} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Gal} \\ \alpha 1,7 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^7\text{--PEtN} \\ \alpha 2,4 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^{2,6} \text{--Lipid A} \\ \alpha \end{array}$
				$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ \text{PPEtN} \end{array}$			
<i>E. coli</i> R3 ^{88,93,94)}	F653	$\begin{array}{c} \text{Glc} \\ \alpha 1,2 \\ \text{Glc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc} \\ \alpha 1,3 \\ \text{Glc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Hep} \\ \alpha 1,7 \\ \text{Hep} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{GlcN} \\ \alpha 1,7 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^7\text{--PEtN} \\ \alpha 2,4 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^{2,6} \text{--Lipid A} \\ \alpha \end{array}$
				$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ \text{PPEtN} \end{array}$			
<i>E. coli</i> R4 ^{88,97)}	F2513	$\begin{array}{c} \text{Gal} \\ \alpha 1,2 \\ \text{Gal} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Gal} \\ \alpha 1,3 \\ \text{Gal} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Hep} \\ \alpha 1,7 \\ \text{Hep} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \\ \alpha 2,4 \\ \text{KDO} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^7\text{--PEtN} \\ \alpha 2,4 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^{2,6} \text{--Lipid A} \\ \alpha \end{array}$
				$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ \text{PPEtN} \end{array}$			
<i>E. coli</i> K-12 ^{88,92)}	W3100 W3110	$\begin{array}{c} \text{Hep} \\ \alpha 1,6 \\ \text{Glc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Gal} \\ \alpha 1,6 \\ \text{Glc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Hep} \\ \alpha 1,7 \\ \text{Hep} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^7\text{--PEtN} \\ \alpha 2,4 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^7\text{--PEtN} \\ \alpha 2,4 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{KDO} \text{--}^{2,6} \text{--Lipid A} \\ \alpha \end{array}$
				$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ \text{PPEtN} \end{array}$			

Fig. 6 Chemical structures of R-core oligosaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella*. Some chemical linkages are not determined unambiguously and dotted lines indicate non-stoichiometric substitution.

その菌体を構成する全ての LPS 分子に含まれる訳ではなく、菌体の生育環境によって変化する場合もあり、LPS は本来混合物である。φX174 の宿主になる腸内細菌群では R-コア構造が比較的良く保存されており、化学構造の多様性は余り大きくないが、機器分析技術の発展に伴って他のグラム陰性菌には想像以上の多様性があることが判ってきた。したがって、今後更に構造の細部が訂正されたり追加される可能性が高い。その辺りの解

説は KAWAHARA らの総説が詳しい⁹⁶⁾。

3-2. LPS の構造と φX174 の感染スペクトル

グラム陰性菌の LPS がバクテリオファージのレセプターであることが証明されて以来、φX174 を含むミクロウイルス科の同族ファージや T 系ファージ、サルモネラ菌に感染する ε¹⁵⁾、ε³⁴⁾、P22 など、多くのファージの感染性と LPS の構造活性相関が盛んに研究された⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾。

TOKUNAGA¹⁰¹⁾ や LINDBERG^{102, 103)}, KANEGASAKI¹⁰⁴⁾ によって多くの研究が網羅された総説がまとめられているが、バクテリオファージの種類はあまりにも多いので、ここでは ϕ X174 とその同族ファージに焦点を絞り、さらに議論を進めることにする。

ϕ X174 の同族ファージはそれぞれが大変似通っていて、特に ϕ X174 と S13 は極めてよく似ている。二つのファージ遺伝子の全塩基数は共に 5386 塩基で同じであり、その内の 5275 ベースまでが同一で相同性は 98% である¹⁰⁵⁾。いっぽう、G4 は ϕ X174 や S13 よりやや大きい 5577 塩基の遺伝子を持ち、 ϕ X174 との相同性は 67% である¹⁰⁶⁾。同族ファージの遺伝子を 26 種類の制限酵素で切断して、その断片を電気泳動的に比較した研究では、G4 は ϕ X174 よりむしろ St-1 に似ていることが判った^{27, 106)}。こうした遺伝子の塩基配列による検討に加えて、宿主への感染性の違いを手がかりにして、同族ファージを主に二つのグループに分類することができる。それらは *E. coli* C 株に感染するグループと *E. coli* K-12 W3110 株に感染するグループである。 ϕ X174 にとって *E. coli* R1 タイプコアを持つ Ra 株である *E. coli* C 株は良好な宿主であるが、それだけでなく R-コア糖鎖が完全に保存された Ra 変異株であれば、*E. coli* R1 から R4 まで全てのコアをもつ大腸菌とさらにサルモネラ菌や赤痢菌の一部も宿主になる。しかし、K-12 コアを持つ Ra 株 (*E. coli* K-12 W3110 株) には感染できない¹⁰⁵⁾。Godson らが単離した一連の G 系列ファージも ϕ X174 の同族ファージである。G 系列ファージは ϕ X174 と同様に *E. coli* C 株を良い宿主とするが、*E. coli* C 株の様な Ra 株より糖鎖の短い LPS を持つ菌株にも広く感染可能な種類もある¹⁰⁵⁾。しかし、*E. coli* K-12 系列の菌株に感染するものはない。ところが、K-12 系列の菌株の細胞を EDTA-リゾチーム処理して細胞壁を分解したスフェロプラストにすると、 ϕ X174 の一本鎖 DNA が侵入できるようになる。入り込んだ DNA によって感染が成立し、成熟ファージ粒子ができ上がることが確認されている¹⁰⁷⁾。いっぽう、同族ファージの中には、この *E. coli* K-12 W3110 株に好んで感染するグループの St-1, ϕ K, U3 が存在し、それらは逆に *E. coli* C 株に感染することができない。この 2 つのグループに属するファージはお互いの粒子から誘導した抗血清の交差反応が起こらず、免疫学的にも違いが認められることから、同族ファ

ジの中でもやや独立したグループとして扱われている²⁷⁾。しかし、BONE らは ϕ X174 の自然変異株の中から *E. coli* K-12 系列の菌株に感染できる変異株 ϕ XtB を単離した^{108, 109)}。その論文に対して、宿主側の遺伝子の要求性¹¹⁰⁾ やゲノムの制限酵素断片パターンの比較¹¹¹⁾ から、もともと *E. coli* K-12 系列に感染可能な St-1 を誤って拾い上げたのではないかとする反論が出された。しかし、 ϕ XtB は St-1 が感染できない *E. coli* C 株に感染・増殖でき、また St-1 とは血清学的に異なっていることが確認され、ついには ϕ X174 の F タンパク質の変異により *E. coli* K-12 株に感染できるようになったことが明らかにされた¹¹²⁾。その後、逆に本来 *E. coli* K-12 系列の菌株に感染する ϕ K の中から *E. coli* C 株や *E. coli* B 株に感染できる変異株も見つかっている¹¹³⁾。したがって、ファージ表面を構成するカプシドタンパク質の僅かな変異によって宿主特異性が大きく変わったと考えられる。また K-12 コアには他の R1~R4 コアと違って、1 つの Hep 残基が外部コアに含まれていることに気が付くが、その点の影響についてもまだ研究されていない。宿主特異性を決めている要因が具体的にカプシドのどのタンパク質と LPS のどの糖残基の相互作用に基づいているのか、大いに興味を持たれるようになった。

そこで、 ϕ X174 は LPS レセプターの何処を認識するかについて調べた報告がある。JAZWINSKI らは、LPS の糖鎖が非還元末端から順次欠損した *S. Typhimurium* の変異株を揃え、その菌体とそれから単離した LPS を使って、 ϕ X174 と同族ファージの S13 が吸着とエクリリースを起こす活性を比較した¹¹⁴⁾。変異株の名前と LPS 構造の対応¹¹⁵⁾ は株名のあとに括弧で示す化学表現系の記号を基に Fig. 5 を参照して欲しい。両ファージともに *S. Typhimurium* TV119 株 (Ra) に対して強く吸着し、エクリリースする速度も高いことが示された。次に非還元末端の GlcNAc 残基を欠いた *S. Typhimurium* SL733 株 (Rb₁) の菌体やその LPS に対して、S13 は強い吸着とエクリリースを示す一方で、 ϕ X174 は弱い反応しか示さなかった。さらに、非還元末端から二番目の Glc 残基まで欠いた *S. Typhimurium* TV161 株 (Rb₂) に対しては、S13 が弱い吸着とエクリリースを示したのみで、 ϕ X174 は全く反応しなかった。このことから、非還元末端の GlcNAc 残基は、 ϕ X174 にとっては重要であるが、S13 にはさほど重要でなく、S13 にとっては二番目

の Glc 残基があれば十分レセプターとして機能することが判り、レセプター認識に重要な糖残基が同族ファージ間で異なることが示された。

また同じ頃 FEIGE らは *E. coli* C 株の各種の変異株を用いて、φX174 の吸着とエキリプス反応の相関を検討した¹¹⁶⁾。その結果、Fig. 6 の二段目に示した *E. coli* R1 コアの Ra 株である *E. coli* C 株の LPS の構造の中で、非還元末端側の Gal 残基が認識に特に重要であり、この一残基が欠けた Rb₁ 株では、吸着の速度は 1/8 に、エキリプス反応速度は 1/60 以下にまで低下した。また、非還元末端の Gal 残基以外にも GlcII 残基に β 結合した分岐部分の Glc 残基も認識に関与しており、この残基が失われると吸着とエキリプス反応速度はそれぞれ 1/2 および 1/8 に低下した。さらに幾つかの糖鎖が欠損した Rb₂ や Rd₂ 株にも数十%程度で速度で吸着が起こったが、エキリプスは全く起こさなかった。したがって、認識に特に重要な残基が非還元末端付近に集中している半面で、そこから遠くに位置する残基も認識に役立っていることが判り、φX174 の認識がある程度広い部分に及んでいると考えられた。

同族ファージの中には Ra 株よりさらに糖鎖の短い LPS を持つ菌株にも感染できる種類がある。G13 ファージは *E. coli* C 株 (Ra) や *S. Typhimurium* TV119 株 (Ra) はもちろん、外部コアのヘキソースの 5 残基のうち 4 残基を欠いた *S. Typhimurium* SL805 株 (Rc) にも感染可能である¹⁰⁹⁾。LINDBERG らの研究グループは、種々の長さの糖鎖を持つ LPS の糖鎖部分 (PS) のみを取り出し、G13 粒子の結合親和性を平衡透析法で検討した。³H で標識された *E. coli* C 株由来の PS の結合定数 K_s は $1.2 \sim 1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ と計算された¹¹⁷⁾。そして各種の PS^{117, 118)} あるいは合成オリゴ糖鎖¹¹⁹⁾ が、G13 に競合的に結合して *E. coli* C 株由来の PS の結合を 50% 阻害する濃度を求め、相対的な親和性を計算した。その結果、*S. Typhimurium* TV161 株 (Rb₂) あるいは *S. Typhimurium* SL805 株 (Rc) の PS が *E. coli* C 株 (Ra) の PS と同等の親和性を示し、また合成 3 糖 α-Man (1→3) [α-Man (1→6)] Man もかなり高い親和性を示した。したがって、G13 ファージのレセプターとして、α-Man (1→3) [α-Man (1→6)] Man あるいは、α-Glc (1→3) [α-Hep (1→7)] α-Hep (1→3) α-Hep (1→5) KDO 部分が最小単位であると

推定した。そして、この最小単位は各種の大腸菌やサルモネラ菌の R-コアに共通的に含まれていることから、G13 の宿主選択性が広い理由を説明できると論じた。

3-3. LPS 糖鎖の立体配座とレセプター活性

R-コア糖鎖に対する認識において、φX174 は非還元末端の一残基の有無を敏感に見分けられるにも拘わらず、*E. coli* R1~R4 コアおよび *Salmonella* コアなど、かなり構造の異なった R-コア糖鎖も認識できる点を説明しようとした仮説が、JANSSON らによって提唱されている¹²⁰⁾。彼らは、HSEA 法と呼ばれる経験的分子力場計算のプログラムを用いて、大腸菌とサルモネラ菌の 6 種類の R-コア糖鎖の立体配座をコンピューターにより計算した。それによると糖鎖は複雑に絡まって立体的に相当に込み合っており、ピラノース環とピラノース環を結ぶグリコシド結合の周りの回転自由度は極めて少ないこと、そして、自由度が少ない中でくみ上がった分子全体の立体配座はかなり剛直なものであるとした。各種の R-コア糖鎖の形は表と裏の特徴的な二面に分けて見ることが可能で、表の面は含まれる原子の組成や形がどのコア構造でも極めて似通っていることが判った。いっぽう、裏の面には各種の R-コア糖鎖に特徴的な形が見られることから、φX174 や G 系列ファージが色々なレセプター糖鎖を認識できるのは、R-コア糖鎖の表の面を認識しているためであろうと説明した。

これとは別にレセプター活性における非還元末端の糖鎖の重要性をコンピューター計算の結果を使って説明した研究もある。YAMANE らは、*E. coli* C 株や *S. Typhimurium* TV119 株の LPS に含まれる外部コアのヘキソース部分について、Molecular Mechanics (MM) と呼ばれる分子力場計算を用いて立体配座を解析した^{121, 122)}。デンプンに含まれる α1-4 結合は螺旋を巻き、またセルロースに含まれる β1-4 結合は直線的に伸び、糖残基間の立体障害を緩和できるのに対して、外部コア 5 糖には α1-2, α1-3 結合など立体的に込み合った結合が多く、グリコシド結合周りの自由度は厳しく制限されることが判った。したがって、込み合った糖残基間のグリコシド結合は、酸素原子とそれを挟むピラノース環の炭素原子を含む結合の二面角 (φ, φ) がある特定の領域に限定されており、安定な配座はほんの数個しか存在し得ないことが明らかになった。そして、

E. coli C 株の 5 糖において、非還元末端の Gal 残基が一つ欠けて 4 糖になった場合には、空間的な自由度が増すことにより若干の余裕が生まれ糖鎖の立体配座が変化すると予想されたが、欠けた糖鎖以外の残りの部分の配座は全く同じ形をしていることが判った。しかし、それらの存在確率を考慮すると、5 糖で最も安定で存在確率の高い配座が 4 糖でも最も存在確率の高い配座であるとは限らない。5 糖において優先的な配座の存在確立は、先端の Gal 残基を欠く 4 糖では 2% 程に減少し、また分岐 Glc 残基を欠く 4 糖では 19% 程に減少すると計算された。ファージは 5 糖で最も安定であった配座を選択的に認識すると考えるならば、その配座の存在確率の減少と FEIGE らの報告した ϕ X174 粒子の *E. coli* C 変異株への吸着速度の減少¹¹⁶⁾ が良い相関を示すことを見出した^{123, 124)}。

したがって LPS の R-コア糖鎖部分の形は、それぞれの糖残基がお互いに影響しあった結果であり、LPS がレセプターとして機能するためには、必要な糖残基が揃っているに加えて、糖鎖が正しい立体配座を取っていることが必要であると著者らは考えている。

4. 構造タンパク質の宿主認識における役割

4-1. カプシド F タンパク質

1992 年に ILAG ら¹²⁵⁾ は ϕ X174 粒子をヒドロキシルアミンで処理して遺伝子を変異させ、950 個のブラークから 21 株の低温感受性株を選抜した。低温感受性株とは、通常ファージ粒子が感染・増殖できる温度でそれができず、感染・増殖のためにより高い温度が必要な変異株のことである。彼らは単離した 21 種の変異株とそれまでに見つかっていた低温感受性株の殆ど全てが F タンパク質中の 216 番目と 233 番目の二つのアルギニン残基の変異に基づく 3 つのグループに分類できることを見いだした。R216 がそれぞれシステインとヒスチジンに置換したグループと、R216 はそのまま、R233 がシステインに置換したグループである。彼らは、その同じ年に発表されたファージ粒子の X 線構造解析のデータ³⁹⁾ を踏まえて実験結果を吟味した。その結果、変異したアルギニン残基は F タンパクが形成するカプシド内部の空洞の表面にあり、これらの変異が F タンパク質と一本鎖 DNA の相互作用を安定化し、また間接的に F

タンパク質に結合している J タンパク質と DNA との相互作用を安定化するために、エクリプスへ移行するための活性化自由エネルギーが大きくなることが判った。そのため、エクリプスを起こす際により高温を要求する様になり、低温感受性になったと結論した。変異株に対してさらに遺伝子の変異を行い選抜すると、アルギニン残基の変異を持ったままでも通常速度でエクリプスする復帰変異株を見つけた。その変異株では H タンパク質の 68 番目のアラニン残基がセリンに置換していることが判った。彼らは H タンパク質の変異が、H タンパク質自身のバックリングと、H と F および H と G の相互作用を不安定化することにより、変異株粒子の基底状態がエネルギー的に高くなり、この変異はエクリプスの速度を速くする方向に働いていると推定した。X 線構造解析では H タンパク質の存在位置が確認できていないが、チャンネルの内部に存在し、H と F と J の 3 つのタンパク質がそれぞれ一本鎖 DNA と結合し、これらのタンパク質-DNA 相互作用およびタンパク質-タンパク質相互作用の崩壊がエクリプス反応の活性化自由エネルギーの大きな山であり、律速段階の一部であると結論した。

4-2. スパイクの存在と機能

ϕ X174 は正 20 面体カプシドの各頂点に突起状のスパイク持っている^{20, 28, 56)}。BROWN らは、電子顕微鏡による観察で、ファージ粒子はスパイクチャンネルの中心を通る 5 回回転軸を膜面に垂直にして、つまりスパイクの部分から宿主細菌に結合していると報告した²⁰⁾。またその時ファージ粒子は、直径の半分くらいの深さまで膜に埋もれていると報告した。そのため、スパイクはファージが宿主菌に結合するための吸着器官であると考えられた。しかし一方で、BAYER らはファージ粒子の菌体への吸着に方向性はなく、膜への埋没の度合いは染色方法によって変化すると報告した²⁸⁾。

SINSHEIMER らのグループは、ファージ粒子を尿素で処理してスパイク部分を取り外したスパイクレス粒子²⁹⁾の菌体への吸着を調べた⁷¹⁾。するとスパイクレス粒子は、宿主にも宿主でない菌株にも区別なく吸着を起こし、選択性が見られなかった。また、もちろん感染性はなかった。そこで、スパイクがファージの宿主菌への選択的な吸着と感染を司ると考えた。その後 1982 年になって MANO らは、ファージ粒子を LPS で処理してエクリプ

スさせた場合に、12カ所あるスパイクの1カ所から太い束状のDNAが飛び出している姿を電子顕微鏡で捕らえた¹²⁶⁾。このことから、φX174はスパイクの部分で宿主菌体を認識して結合し、そこからDNAを放出して感染するモデルが信じられるようになった。

4-3. スパイクHタンパク質

MANOらの電子顕微鏡写真が発表される以前に、HAYASHIら¹²⁷⁾はH遺伝子に欠損のあるファージ遺伝子を宿主菌に感染させ、その細胞中にHマイナス粒子と呼ばれるHタンパク質以外の総てのタンパク質と一本鎖DNAを含む粒子ができることを見つけた。Hマイナス粒子は宿主菌に感染できないが、その一本鎖DNAは大腸菌の細胞壁を酵素消化したスフェロプラストには感染できることから、Hタンパク質が感染に重要であることを示した。

さらにJAZWINSKIらは¹²⁸⁾、Hタンパク質が一本鎖DNAと結合して、一本鎖DNAのスフェロプラストへの感染を強く促進すると報告した。また、一本鎖DNAとHタンパク質複合体のスフェロプラストへの感染が抗H抗体によって阻害され、また、宿主菌のLPSによっても阻害されることから、Hタンパク質はLPSを認識して結合する役目を持ち、さらに、DNAと共に菌体内へ入る“パイロットタンパク質”であるとした。しかし、彼らの実験には疑問点もある。彼らが一本鎖DNAのスフェロプラストへの感染をHタンパク質が促進したとする根拠は、野生型ファージを感染させた菌体の抽出液を一本鎖DNAと混ぜた場合には促進効果があるが、H遺伝子にアンバー変異のあるファージ（Hマイナス粒子に準ずるもの）を感染させた菌体の抽出液には促進効果がないことに基づいているに過ぎない。また彼らの用いた抗H抗体も決して純粋な物ではない。ファージ粒子全体を使って誘導した抗血清（ポリクローナル）に対して、SINSHEIMERらの方法²⁹⁾でファージ粒子を尿素処理して得たスパイクレス粒子を反応させて抗F抗体部分を除き、ついでH遺伝子にアンバー変異を持つ粒子と反応させて抗G抗体部分を除き、その残りの抗血清を抗H抗体として用いている。菌体の抽出液には無数の化合物が含まれることや、ポリクローナル抗体の中にHタンパク質以外のものに反応する抗体が本当に含まれていなかったか、などを考えるといささか大まかな実

験のように思える。さらにJAZWINSKIらは、一本鎖DNAが二本鎖DNAに複製される過程にHタンパク質が関与する可能性を報告している¹²⁹⁾。その根拠として、³²Pで一本鎖DNAを放射能標識したファージを感染させた菌体を破碎してタンパク質を回収すると、電気泳動上でHタンパク質に相当するバンドにRF-DNAに由来する放射活性が強固に結合していることを挙げている。この様にファージ遺伝子と共に宿主菌体の中へ移行するパイロットタンパク質がφX174以外にも大腸菌に感染するファージMu¹³⁰⁻¹³²⁾、R17¹³³⁾、M13¹³⁴⁾、fd¹³⁵⁾や枯草菌に感染するファージφ29¹³⁶⁾などにも見つかっていることから、φX174ファージにおいてもHタンパク質がパイロットタンパク質であることもさほど無理ではない。一つのファージ粒子に12分子含まれるHタンパク質の何分子が菌体内に入るかなど、さらなる研究が望まれる。

4-4. スパイクGタンパク質

Hタンパク質がファージの吸着と感染を司る多機能タンパク質であると考えられるようになったが、JAZWINSKIらの結果を疑問視する意見がTESSMANらによって出された²⁶⁾。その内容は以下の様である。種々の同族ファージの遺伝子配列が解析されるにつれて、HやFタンパク質のアミノ酸配列は同族ファージ間で比較的良く保存されているのに対して、Gタンパク質のアミノ酸配列が最も保存されていないことが判った^{105, 106, 137)}。したがって、スパイクを形成しているGタンパク質がファージの吸着と宿主選択性を支配しており、Gタンパク質のアミノ酸配列が最も保存されていないことと、同族ファージの宿主選択性が多様であることが対応している。その証拠としてホストレンジ変異株にGタンパク質の変異体が見つかった^{107, 138)}ことを挙げている。ホストレンジ変異株とは宿主選択性が変化した変異株のことである。しかし、HやFタンパク質の変異体にも同様にホストレンジ変異株が見つかった¹⁰⁷⁾ことから、決め手には成らず、どのタンパク質がファージの吸着と宿主認識あるいは感染を支配するのか、結論が出ないままで20年以上が経過した。

5. スパイクタンパク質と LPS の相互作用

5-1. スパイクタンパク質の遺伝子工学的な調製と LPS との特異的相互作用

それでは H と G タンパク質のどちらが LPS を認識するのであろうか？近年著者らはこの疑問に対する解答を得ることができた¹³⁹⁻¹⁴²⁾。結論は、“どちらも認識する”である。 ϕ X174 の遺伝子の H タンパク質をコードする領域を RF-DNA を鋳型とした PCR (polymerase chain reaction) により増幅し、増幅した DNA 断片を高発現プラスミド pMalc2¹⁴³⁾ にクローニングした。H タンパク質は、プラスミドに作り込まれた大腸菌のマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質 (MBP-H) として組み換え大腸菌内で発現され、アミロースとの相互作用を利用したアフィニティークロマトグラフィーによって単一に精製することができた。MBP-H は ϕ X174 の宿主である *E. coli* C 株や *S. Typhimurium* TV119 株由来の LPS と結合することが蛍光強度の変化として観察することができた。いっぽう、H タンパク質部分を持たない MBP は、それらの LPS を加えても蛍光強度が変化しなかったことから、MBP-H の H 部分が LPS と結合することが示唆された¹³⁹⁾。

MBP-H における MBP 部分 (43 kDa) は H タンパク質 (34 kDa) より分子量的に大きく、観測された LPS

とのレスポンスが間接的であることが心配された。そこで、著者らは H タンパク質の N 末端にヒスチジntag¹⁴⁴⁾ と呼ばれる連続した 6 つのヒスチジン残基を付加した融合タンパク質 (HisH) を調製した。ヒスチジntag とニッケル金属との親和性を利用するアフィニティークロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーにより電気泳動的に単一の HisH を得た。つぎに、HisH と LPS の相互作用を酵素リンク法を用いて調べた。樹脂製の 96 穴プレートに HisH を吸着させ、宿主や非宿主由来の LPS と相互作用させた。この時に用いた LPS で初出のものの構造を Fig. 7 にまとめた。LPS はビオチン標識されており、ビオチンにストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体 (STP-POD) をカップリングして、 α -フェニレンジアミンの酸化で生じるオレンジ色の吸光度を 490 nm で測定した (Fig. 8A)。その結果 HisH は、 ϕ X174 の宿主である *E. coli* C 株や *S. Typhimurium* TV119 株の LPS と強く相互作用するのに対して、糖鎖が短い *E. coli* F583 株 (Rd₂) や O-抗原多糖を持つ *E. coli* O111:B4 株 (S) などの非宿主の LPS とは殆ど結合しないことが判った。HisH の LPS 結合の選択性がファージの宿主選択性と一致したことから、H タンパク質は宿主の LPS を特異的に認識することが証明された¹⁴⁰⁾。

さらに著者らは、スパイクを構成するもう一つのタン

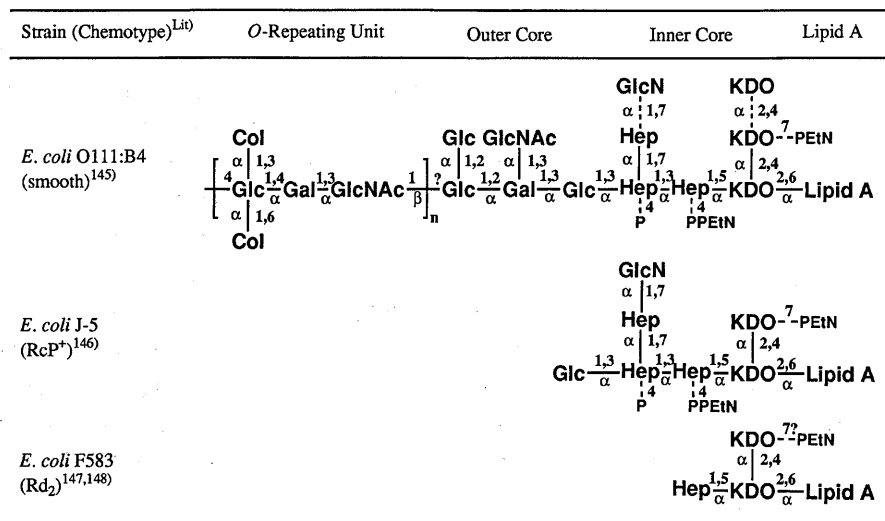


Fig. 7 Chemical structures of LPSs of some strains of *Escherichia coli*.

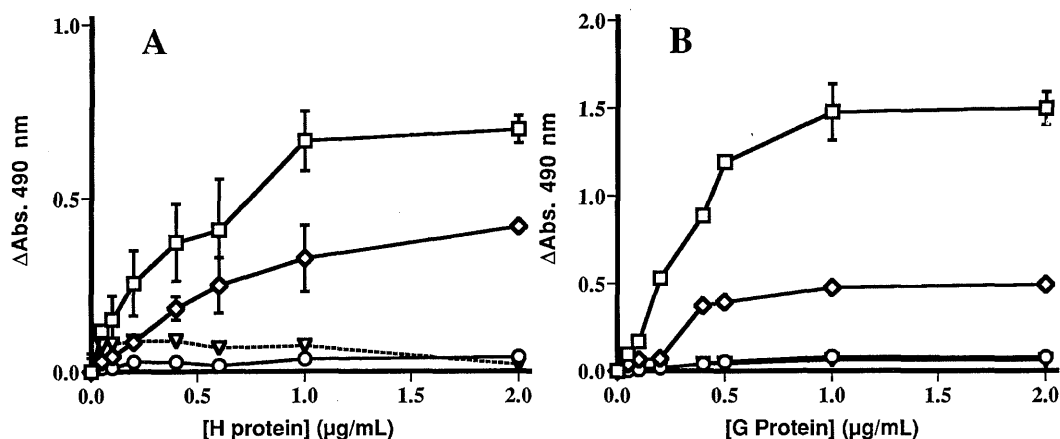


Fig. 8 Detection of binding of LPSs with spike proteins H (A) and G (B) by the enzyme-linked plate assay.^{140, 142)}

Conditions: H or G protein (0-2 μg/mL) was immobilized onto polystyrene wells and treated with a fixed concentration (0.5 μg/mL) of biotin-labelled LPSs from: *E. coli* C (□), *S. Typhimurium* TV119 (◇), *E. coli* F583 (▽), and *E. coli* O111:B4 (○). Coloring substrate *o*-phenylenediamine (2 mg/mL) was dropped to the wells (100 μL) and the STP-POD reaction was allowed for 4 min at room temperature. The developed yellow color was measured at 490 nm.

パク質である、Gタンパク質についてもLPS認識能力があるか関心をもち、Gタンパク質のヒスチジントグ融合体(HisG)も調製した。酵素リンク法による検討の結果、Fig. 8Bに示すように、HisGもφX174宿主由来のLPSと強く相互作用し、非宿主由来のLPSとは殆ど結合しなかった¹³⁶⁾。したがって、φX174はスパイクタンパク質HとGの両方でレセプターであるLPSを認識していることが証明された。

5-2. スパイクタンパク質によるLPS上の認識部位

つぎに、HおよびGタンパク質がLPSのどの部分を認識するかを検討することを目的として、*E. coli* C株のLPSと各種菌株由来のLPSを競合的に結合させる方法で、両タンパク質の各種のLPSに対する相対的な親和性を求めた(Table 2)^{149, 150)}。*E. coli* C株LPSの親和性を100%とした場合に、*S. Typhimurium* TV119株(Ra)や*E. coli* EH100株(Ra)など宿主由来のLPSはどちらのタンパク質に対しても68-110%程度の強い結合を示した。*S. Typhimurium* SL684株(Rc)や

E. coli J-5株(RcP⁺)のLPSでは、14-19%の相対結合力であった。これらのLPSは*Salmonella* コアや*E. coli* R3 コアのヘキソース領域の5残基の内4残基を欠いている。そして*E. coli* R1 コアのHep残基1つを残す*E. coli* F583株(Rd₂)のLPSとの結合は、数%にまで低下した。このことから、R-コア糖鎖の非還元末端付近のヘキソース残基の存在が両タンパク質の認識に重要なことが判る。いっぽう、S型株である*E. coli* O111:B4株のLPSとは両タンパク質とも相対的にごく弱い結合しか起こさない。このことは、φX174がO-抗原多糖を持たないR型菌にしか感染できないことと良く一致する。また、Hに比較してGタンパク質では糖鎖の短いLPSに対してもある程度の親和性を示す。したがって、どちらも先端糖鎖部分が重要でありながら、両者のLPS認識範囲に若干の違いが認められる。ファージ粒子がスパイク部分で宿主細菌の外膜に突き刺さるのであれば、GとHでは3次元的な配置が異なるので、LPSとの接触点も当然異なると考えれば妥当であろう。

Table 2. Relative binding affinity of various LPSs with spike proteins of H and G.^{149, 150)}

Origin of LPS	Chemotype	Relative affinity (%)	
		H	G
<i>E. coli</i> C	Ra	100	100
<i>S. Typhimurium</i> TV119	Ra	110	98
<i>E. coli</i> EH100	Ra	n. d.	68
<i>S. Typhimurium</i> SL684	Rc	14	19
<i>E. coli</i> J-5	RcP ⁺	3	n. d.
<i>E. coli</i> F583	Rd ₂	1	24
<i>E. coli</i> O111: B4	smooth	0.2	9

Conditions: Various LPSs (0-500 $\mu\text{g/mL}$) competed with the biotin-labelled LPS of *E. coli* C (5 $\mu\text{g/mL}$) in the enzyme-linked plate assay for the binding to spike proteins H and G. The concentrations needed for 50% inhibition ($I_{50\%}$) ($\mu\text{g/mL}$) were compared with the $I_{50\%}$ value by non-labelled LPS of *E. coli* C as a standard (100%), and each relative affinity was calculated. N. d. means not determined.

5-3. スパイクタンパク質の LPS との相互作用によるコンホメーション変化

また、著者らは LPS との結合による HisH の蛍光スペクトルの変化を調べることで両者の結合を定量的に解析した¹⁴¹⁾。HisH の蛍光強度は、LPS との結合により大幅に増大し、蛍光極大 λ_{max} が短波長側にシフトした。これは H タンパク質と LPS の相互作用が極めて疎水的であることを示す。そして、蛍光強度変化の LPS 濃度依存性を解析した結果、解離定数 K_d は 22°C において、 $7.02 \pm 0.37 \mu\text{M}$ と計算され、両者の結合が極めて強いことが判った。また、 K_d の温度依存性から、活性化エンタルピー $-\Delta H^\circ$ は +23.7 kJ/mol と正の値であり、これは両者の結合がエンタルピー的には不利であることを示す。しかし、それを補って余りある大きなエントロピー変化 $T\Delta S^\circ = 52.8 \text{ kJ/mol}$ (22 °C) が伴うことから、この結合はエントロピー駆動型であることが判った。これに加えて、タンパク質の蛍光強度が著しく変化したことから、LPS との結合によって HisH のコンホメーションが変化していることが示唆される。

いっぽう、HisG は LPS と結合することにより、 λ_{max} は変化せず僅かに蛍光強度が減少した。これは LPS との結合によって、HisG のトリプトファン残基の周囲の環境が親水性に変化したことを意味する。同様に解離定数 K_d は 25°C において $0.87 \pm 0.08 \mu\text{M}$ と計算され、HisG は HisH よりも更に 10 倍以上強く LPS に結合すること

が明らかになった¹⁵⁰⁾。したがって、H タンパク質はスパイクチャンネルの内部に存在すると考えるならば、ファージ粒子の宿主菌への吸着は主に G タンパク質が司ると考えられる。また、HisG においても LPS とエントロピー駆動型の結合を起こすことから、HisG も LPS と結合して同様にコンホメーション変化を起こすと考えている。したがって著者らは、ファージ粒子が LPS を含む宿主菌の表面に結合する際には、まず G タンパク質のスパイクが吸着してコンホメーション変化を起こし、そして次に H タンパク質が飛び出して LPS との疎水的な相互作用を行い、これもまた構造を変化させると予想している。このように両スパイクタンパク質が“動く”ことが、エクリプスへの動きの引き金を引くと考えられる。しかし、まだそれで解決する訳ではない。ファージ粒子がエクリプスを起こすためには二価カチオン、とくに Ca^{2+} イオンが必要である⁶⁷⁻⁷⁰⁾ が、X 線回折の差フーリエ解析によって、 $\phi\text{X174}^{151)}$ や $\text{G4}^{152)}$ 粒子の F タンパク質が Ca^{2+} イオンの結合前後でコンホメーション変化を起こすことが明らかになった。また、F タンパク質に LPS の断片と考えられる Glc 分子が結合していることも明らかになった¹⁵¹⁾ ことから、やはり F タンパク質も LPS と結合してエクリプスへの引き金に関与することは確実であろう。そこで今後、F タンパク質と LPS の結合やそれによるコンホメーション変化を確かめねばならないし、G と H、あるいは、G と F あるいは H と F が集まることが

LPS 認識に及ぼす影響とその意味や各タンパク質の動きがどの様にエキリプスの動きに繋がっていくのかを研究する必要がある。

おわりに

バクテリオファージ φX174 はこれまで最も良く研究されたファージの 1 つであるが、まだまだ判らないことが多い。近年には X 線構造解析も行われたが、最も気になる H タンパク質については、その位置も構造も明らかにならないままである。しかし、仮に構造が判ったとしても機能を推定することに大いに役立つが、機能を解明できたことにはならず、これから一つ一つのタンパク質が如何なる機能を持ち、それがどの様に発揮されるかを研究する必要は変わらないばかりか、それらを解決せねば感染機構の真の解明には到底至らない。

φX174 はとても小さく単純なウイルスであるが、それ故に遺伝子に書き込まれた情報の総ての機能とその機能を調節する仕組みが解明できるかも知れないと考えるならば、ポストゲノムの時代においてもなお魅力的な研究題材である。さらに、φX174 の宿主認識が大腸菌の膜の上で起こることも魅力的である。いわゆる脂質二重膜は生体における分子認識や情報伝達の間であることから、φX174 の分子認識には何らかの普遍的な仕組みが存在する様に思われるからである。ライフサイエンスの発展に貢献することも期待しながら、この小さなウイルスに引き続き注目していきたい。

謝 辞

これまで φX174 の研究テーマと一緒に取り組み、研究を進展させてくれた共同研究者の皆様、学部生・大学院生の皆様に深く感謝いたします。本総説を執筆するに当たり、東京工業大学の有坂文雄先生には全体に渡って数多くのご助言を頂きました。グラム陰性菌の膜と LPS の構造に関して、北里研究所の川原一芳先生にご助言を頂きました。糖鎖の立体配座解析に関する記述では、松阪大学短期大学部の山根章宏先生にご助言を頂きました。ファージ型別についての記述では高知医科大学の松崎茂展先生、国立感染症研究所の泉谷秀昌博士にご助言を頂きました。皆様にお礼申し上げます。また、本

総説を執筆する機会を与えて下さいました三重大大学生物資源学部の田中晶善先生および原稿を査読頂いてご助言頂いた審査委員の先生方にお礼申し上げます。

略 語

Ac: アセチル基, Glc: D-グルコース, Gal: D-ガラクトース, Man: D-マンノース, KDO: 3-デオキシ-D-manno-オクツロソン酸, Hep: L-glycero-D-manno-ヘプトース, GlcN: グルコサミン (2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコース), GlcNAc: N-アセチルグルコサミン (2-アセトアミノ-2-デオキシ-D-グルコース), Rha: L-ラムノース, Abe: アベコース (3, 6-ジデオキシ-D-ガラクトース), Col: コリトース (3, 6-ジデオキシ-L-ガラクトース), P: リン酸残基, PEtN: エチルアミノリン酸残基, SS-DNA: 一本鎖 DNA, RF-DNA: 複製型二本鎖 DNA, HSEA: Hard Sphere Exo Anomeric 法, HisH: ヒスチジンタグ H タンパク質, HisG: ヒスチジンタグ G タンパク質, MBP: マルトース結合タンパク質, MBP-H: H タンパク質-マルトース結合タンパク質融合体, PCR: polymerase chain reaction, LPS: lipopolysaccharide (リポ多糖), PS: LPS のリピド A 部分を除く糖鎖部分, EDTA: エチレンジアミン 4 酢酸,

要 約

バクテリオファージ φX174 は直径約 26 nm の小型正二十面体ファージで、ひとつの環状一本鎖 DNA と 4 つの構造タンパク質からなり、最も単純なウイルスの 1 つである。最も詳しく研究されたファージの 1 つでもあるが、まだまだ判らないことも多い。とくに宿主細菌の認識と感染に関する機構はまだ解明されていない。本総説は、1) φX174 の構造と形態形成、2) ファージ感染の三段階、3) ファージレセプターとしてのリポ多糖の構造と機能、4) 構造タンパク質の宿主認識における役割、および 5) スパイクタンパク質とリポ多糖の相互作用、に関する知見をまとめて φX174 の宿主認識機構を解説する。

文 献

- 1) STENT, G. S. Twort-d'Herelle 現象. バクテリオファージその分子生物学 (渡辺 格, 三宅 端, 柳沢桂子 訳, 岩波書店), 第1章, p 1-20 (1972).
- 2) 生田 哲. ウイルスと感染の仕組み. 日本実業出版, p. 24-27, 52-54 (1996).
- 3) 有坂文雄. T4 ファージの複製と遺伝子発現. 生命科学を推進する分子ウイルス学 (石浜 明, 永井美之, 藤永 蕙, 三浦謹一郎 編集, 共立出版), 蛋白質核酸酵素 1992 年 10 月号増刊, 37 (14): 2570-2579 (1992).
- 4) TESSMAN, I. Some unusual properties of the nucleic acid in bacteriophages S13 and ϕ X174. *Virology*, 7 (3): 263-275 (1959).
- 5) MORITA, J., N. KASHIMURA and T. KOMANO. The mechanism of inactivation of bacteriophage ϕ X174 by autoxidizable synthetic polysaccharides. *Agric. Biol. Chem.*, 44 (12): 2971-2978 (1980).
- 6) MORITA, J., T. OKUGAWA and T. KOMANO. Inactivation of *Escherichia coli* phages by sugar phosphates. *Agric. Biol. Chem.*, 46 (1): 279-280 (1982).
- 7) HAYASHI, M., A. AOYAMA, D. L. RICHARDSON Jr. and M. N. HAYASHI. Biology of the bacteriophage ϕ X174. in *The Bacteriophages* (ed. by CALENDAR, R., Plenum Press, New York and London.) Volume 2, p 1-71 (1988).
- 8) 駒野 徹. ϕ X174 の増殖機構-最近の進歩から. 蛋白質核酸酵素, 14 (1): 2-15 (1969).
- 9) 上田國寛. ϕ X174 ファージ DNA の *in vitro* 複製. 生化学, 50 (4): 241-265 (1978).
- 10) ACKERMANN, H. - W. and M. S. DUBOW. Practical applications of bacteriophages. in *Viruses of Prokaryotes* (CRC Press, Boca Raton.) Volume I, General Properties of Bacteriophages, Chapter 7, p 143-172 (1987).
- 11) BARKER, R. M. and D. C. OLD. The usefulness of biotyping in studying the epidemiology and phylogeny of salmonellae. *J. Med. Microbiol.*, 29 (2): 81-88 (1989).
- 12) THRELFALL, E. J. and J. A. FROST. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: Laboratory aspects and epidemiological applications. *J. App. Bacteriol.*, 68 (1): 5-16 (1990).
- 13) 河西 勉. サルモネラの phage typing について (第1報) *Salmonella good* からの phage 分離と phage typing について. 衛生試験所報告, 90: 75-80 (1972).
- 14) 中村明子. ファージ型別 *Salmonella* serovar Typhi, *Salmonella* serovar Enteritidis. 臨床と微生物, 23 (6): 725-730 (1996).
- 15) BRADLEY, D. E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.*, 31 (4): 230-314 (1967).
- 16) 小熊恵二. バクテリオファージ. 医科ウイルス学 (大里外誉郎 編集, 南江堂), 第4章ウイルスの生物学 A 節, p. 47-61 (1992).
- 17) SINSHEIMER, R. L. Purification and properties of bacteriophage ϕ X174. *J. Mol. Biol.*, 1 (1): 37-42 (1959).
- 18) SINSHEIMER, R. L. A single-stranded deoxyribonucleic acid from bacteriophage ϕ X174. *J. Mol. Biol.*, 1 (1): 43-53 (1959).
- 19) KARAM, J. T. Molecular Biology of Bacteriophage T4. American Society of Microbiology, Washington D. C. (1994).
- 20) BROWN, D. T., J. M. MACKENZIE and M. E. BAYER. Mode of host cell penetration by bacteriophage ϕ X174. *J. Virol.*, 7 (6): 836-846 (1971).
- 21) SANGER, F., G. M. AIR, B. G. BARRELL, N. L. BROWN, A. R. COULSON, J. C. FIDDES, C. A. HUTCHISON III, P. M. SLOCOMBE and M. SMITH. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*, 265: 687-695 (1977).
- 22) SANGER, F., A. R. COULSON, T. FRIEDMANN, G. M. AIR, B. G. BARRELL, N. L. BROWN, J. C. FIDDES, C. A. HUTCHISON III, P. M. SLOCOMBE and M. SMITH. The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174. *J. Mol. Biol.*, 125 (2): 225-246 (1978).
- 23) AIR, G. M., A. R. COULSON, J. C. FIDDES, T. FRIEDMANN, C. A. HUTCHISON III, F. SANGER, P. M. SLOCOMBE and A. J. H. SMITH. Nucleotide sequence of the F protein coding region of bacteriophage ϕ X174 and the amino acid sequence of its product. *J. Mol. Biol.*, 125 (2): 247-254 (1978).
- 24) SANGER, F., G. M. AIR, B. G. BARRELL, N. L. BROWN, A. R. COULSON, J. C. FIDDES, C. A. HUTCHISON III, P. M. SLOCOMBE, M. SMITH, J. DROUIN, T. FRIEDMANN and A. J. H. SMITH. The nucleotide sequence of the DNA of ϕ X174 *cs* 70 and the amino acid sequence of the proteins for which it codes. in *The Single-Stranded DNA Phages* (eds. by DENHARDT, D. T., D. DRESSLER and D. S. RAY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) p 659-669 (1978).
- 25) 林 多紀. ϕ X-174 バクテリオファージの遺伝子. 蛋白質核酸酵素, 21 (3): 192-204 (1976).
- 26) TESSMAN, E. S. and I. TESSMAN. The genes of the isometric phages and their functions. in *The Single-Stranded DNA Phages* (eds. by DENHARDT, D. T., D. DRESSLER and D. S. RAY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) p 9-29 (1978).

- 27) GODSON, G. N. The other isometric phages. in *The Single-Stranded DNA Phages* (eds. by DENHARDT, D. T., D. DRESSLER and D. S. RAY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) p 103-112 (1978).
- 28) BAYER, M. E. and R. W. DEBLOIS. Diffusion constant and dimension of bacteriophage ϕ X174 as determined by self-beat laser light spectroscopy and electron microscopy. *J. Virol.*, **14** (4): 975-980 (1974).
- 29) EDGELL, M. H., C. A. HUTCHISON III and R. L. SINSHEIMER. The process of infection with bacteriophage ϕ X174 XXVIII. Removal of the spike proteins from the phage capsid. *J. Mol. Biol.*, **42** (3): 547-557 (1969).
- 30) SHANK, P. R., C. A. HUTCHISON III and M. H. EDGELL. Isolation and characterization of the four major proteins in the virion of bacteriophage ϕ X174. *Biochemistry*, **16** (21): 4545-4549 (1977).
- 31) BURGESS, A. B. Studies on the proteins of ϕ X174, II. The protein composition of the ϕ X coat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **64** (2): 613-617 (1969).
- 32) DANN-MARKERT, A., H. F. DEUTSCH and W. ZILLIG. Studies on the coat protein of bacteriophage ϕ X174. *Virology*, **29** (1): 126-132 (1966).
- 33) POLJAK, R. J. A study of the coat proteins of bacteriophage ϕ X174. *Virology*, **35** (2): 185-193 (1968).
- 34) FREYMEYER II, D. K., P. R. SHANK, M. H. EDGELL, C. A. HUTCHISON III and T. C. VANAMAN. Amino acid sequence of the small core protein from bacteriophage ϕ X174. *Biochemistry*, **16** (21): 4550-4556 (1977).
- 35) HAMATAKE, R. K., A. AOYAMA and M. HAYASHI. The J gene of bacteriophage ϕ X174: *In vitro* analysis of J protein function. *J. Virol.*, **54** (2): 345-350 (1985).
- 36) FANE, B. A., S. HEAD and M. HAYASHI. Functional relationship between the J proteins of bacteriophages ϕ X174 and G4 during phage morphogenesis. *J. Bacteriol.*, **174** (8): 2717-2719 (1992).
- 37) JENNINGS, B. and B. A. FANE. Genetic analysis of the ϕ X174 DNA binding protein. *Virology*, **227** (2): 370-377 (1997).
- 38) WILLINGMANN, P., S. KRISHNASWAMY, R. MCKENNA, T. J. SMITH, N. H. OLSON and M. G. ROSSMANN. Preliminary investigation of the phage ϕ X174 crystal structure. *J. Mol. Biol.*, **212** (2): 345-350 (1990).
- 39) MCKENNA, R., D. XIA, P. WILLINGMANN, L. L. ILAG, S. KRISHNASWAMY, M. G. ROSSMANN, N. H. OLSON, T. S. BAKER and N. L. INCARDONA. Atomic structure of single-stranded DNA bacteriophage ϕ X174 and its functional implications. *Nature*, **355** (6356): 137-143 (1992).
- 40) MCKENNA, R., L. L. ILAG and M. G. ROSSMANN. Analysis of the single-stranded DNA bacteriophage ϕ X174, refined at a resolution of 3.0 Å. *J. Mol. Biol.*, **237** (5): 517-543 (1994).
- 41) DOKLAND, T., R. A. BERNAL, A. BURCH, S. PLETNEV, B. A. FANE and M. G. ROSSMANN. The role of scaffolding proteins in the assembly of the small, single-stranded DNA virus ϕ X174. *J. Mol. Biol.*, **288** (4): 595-608 (1999).
- 42) BAKER, T. S., N. H. OLSON and S. D. FULLER. Adding the third dimension to virus life cycles: Three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63** (4): 862-922 (1999).
- 43) OLSON, N. H., T. S. BAKER, P. WILLINGMANN and N. L. INCARDONA. The three-dimensional structure of frozen-hydrated bacteriophage ϕ X174. *J. Struct. Biol.*, **108** (2): 168-175 (1992).
- 44) HAYASHI, M. Morphogenesis of the isometric phages. in *The Single-Stranded DNA Phages* (eds. by DENHARDT, D. T., D. DRESSLER and D. S. RAY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) p 531-547 (1978).
- 45) TONEGAWA, S. and M. HAYASHI. Intermediates in the assembly of ϕ X174. *J. Mol. Biol.*, **48** (2): 219-242 (1970).
- 46) FUJISAWA, H. and M. HAYASHI. Assembly of bacteriophage ϕ X174: Identification of a virion capsid precursor and proposal of a model for the functions of bacteriophage gene products during morphogenesis. *J. Virol.*, **24** (1): 303-313 (1977).
- 47) MUKAI, R., R. K. HAMATAKE and M. HAYASHI. Isolation and identification of bacteriophage ϕ X174 prohead. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76** (10): 4877-4881 (1979).
- 48) AOYAMA, A. and M. HAYASHI. *In vitro* packaging of plasmid DNAs into ϕ X174 bacteriophage capsid. *Nature*, **297** (5868): 704-706 (1982).
- 49) FUJISAWA, H. and M. HAYASHI. Two infectious forms of bacteriophage ϕ X174. *J. Virol.*, **23** (2): 439-442 (1977).
- 50) EKECHUKWU, M. C. and B. A. FANE. Characterization of the morphogenetic defects conferred by cold-sensitive prohead accessory and scaffolding proteins of ϕ X174. *J. Bacteriol.*, **177** (3): 829-830 (1995).
- 51) DOKLAND, T., R. MCKENNA, L. L. ILAG, B. R. BOWMAN, N. L. INCARDONA, B. A. FANE and M. G. ROSSMANN. Structure of a viral procapsid with molecu-

- lar scaffolding. *Nature*, **389** (6648): 308-313 (1997).
- 52) ILAG, L. L., N. H. OLSON, T. DOKLAND, C. L. MUSIC, R. H. CHENG, Z. BOWEN, R. MCKENNA, M. G. ROSSMANN, T. S. BAKER and N. L. INCARDONA. DNA packaging intermediates of bacteriophage ϕ X174. *Structure*, **3** (4): 353-363 (1995).
 - 53) BURCH, A. D., J. TA and B. A. FANE. Cross-functional analysis of the *Microviridae* internal scaffolding protein. *J. Mol. Biol.*, **286** (1): 95-104 (1999).
 - 54) BURCH, A. D. and B. A. FANE. Foreign and chimeric external scaffolding proteins as inhibitors of *Microviridae* morphogenesis. *J. Virol.*, **74** (20): 9347-9352 (2000).
 - 55) BURCH, A. D. and B. A. FANE. Efficient complementation by chimeric *Microviridae* internal scaffolding proteins is a function of the COOH-terminus of the encoded protein. *Virology*, **270** (2): 286-290 (2000).
 - 56) BAYER, M. E. and T. W. STARKEY. The adsorption of bacteriophage ϕ X174 and its interaction with *Escherichia coli*; a kinetic and morphological study. *Virology*, **49** (1): 236-256 (1972).
 - 57) NEWBOLD, J. E. and R. L. SINSHEIMER. The process of infection with bacteriophage ϕ X174 XXXII. Early steps in the infection process: attachment, eclipse, and DNA penetration. *J. Mol. Biol.*, **49** (1): 49-66 (1970).
 - 58) INCARDONA, N. L., R. BLONSKI and W. FEENEY. Mechanism of adsorption and eclipse of bacteriophage ϕ X174 I. *In vitro* conformational change under conditions of eclipse. *J. Virol.*, **9** (1): 96-101 (1972).
 - 59) BAYER, M. E. Adsorption of bacteriophages to adhesions between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Virol.*, **2** (4): 346-356 (1968).
 - 60) BAYER, M. E., H. THUROW and M. H. BAYER. Penetration of the polysaccharide capsule of *Escherichia coli* (B1161/42) by bacteriophage K29. *Virology*, **94** (1): 95-118 (1979).
 - 61) MÜHLRADT, P. F., J. MENZEL, J. R. GOLECKI and V. SPETH. Outer membrane of *Salmonella*. Sites of export of newly synthesised lipopolysaccharide on the bacterial surface. *Eur. J. Biochem.*, **35** (3): 471-481 (1973).
 - 62) KNIPPERS, R., W. O. SALIVAR, J. E. NEWBOLD and R. L. SINSHEIMER. The process of infection with bacteriophage ϕ X174 XXVI. Transfer of the parental DNA of bacteriophage ϕ X174 into progeny bacteriophage particles. *J. Mol. Biol.*, **39** (3): 641-654 (1969).
 - 63) LABEDAN, B., K. B. HELLER, A. A. JASAITIS, T. H. WILSON and E. B. GOLDBERG. A membrane potential threshold for phage T4 DNA injection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93** (2): 625-630 (1980).
 - 64) INCARDONA, N. L. Mechanism of adsorption and eclipse of bacteriophage ϕ X174 III. Comparison of the activation parameters for the *in vitro* and *in vivo* eclipse reactions with mutant and wild-type virus. *J. Virol.*, **14** (3): 469-478 (1974).
 - 65) INCARDONA, N. L. and U. R. MÜLLER. Eclipse kinetics as a probe of quaternary structure in bacteriophage ϕ X174. *J. Mol. Biol.*, **181** (4): 479-486 (1985).
 - 66) INCARDONA, N. L., J. K. TUECH and G. MURTI. Irreversible binding of phage ϕ X174 to cell-bound lipopolysaccharide receptors and release of virus-receptor complexes. *Biochemistry*, **24** (23): 6439-6446 (1985).
 - 67) FUJIMURA, R. and P. KAESBERG. The adsorption of bacteriophage ϕ X174 to its host. *Biophys. J.*, **2**: 433-449 (1962).
 - 68) INCARDONA, N. L. and L. SELVIDGE. Mechanism of adsorption and eclipse of bacteriophage ϕ X174 II. Attachment and eclipse with isolated *Escherichia coli* cell wall lipopolysaccharide. *J. Virol.*, **11** (5): 775-782 (1973).
 - 69) ROWATT, E. The role of bivalent ions in the inactivation of bacteriophage ϕ X174 by lipopolysaccharide from *Escherichia coli* C. *Biochem. J.*, **223** (1): 23-29 (1984).
 - 70) ROWATT, E. and R. J. P. WILLIAMS. The effect of multivalent ions on the inactivation of bacteriophage ϕ X174 by lipopolysaccharide from *Escherichia coli* C. *Biochem. J.*, **231** (3): 765-768 (1985).
 - 71) NEWBOLD, J. E. and R. L. SINSHEIMER. Process of infection with bacteriophage ϕ X174 XXXIV. Kinetics of the attachment and eclipse steps of the infection. *J. Virol.*, **5** (4): 427-431 (1970).
 - 72) INCARDONA, N. L. Application of Arrhenius kinetic theory to viral eclipse: Selection of bacteriophage ϕ X174 mutants. *J. Virol.*, **39** (2): 510-518 (1981).
 - 73) INCARDONA, N. L. Adsorption and eclipse reactions of the isometric phages. in *The Single-Stranded DNA Phages* (eds. by DENHARDT, D. T., D. DRESSLER and D. S. RAY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) p 549-555 (1978).
 - 74) JAZWINSKI, S. M. and R. MARCO. *In vitro* analysis of the steps in the uncoating and replication of ϕ X174 DNA. *Fed. Proc.*, **32**: 491 (1973).
 - 75) NEUWALD, P. D. *In vitro* system for the study of bacteriophage ϕ X174 adsorption and eclipse. *J. Virol.*, **15** (3): 497-508 (1975).

- 76) 川原一芳. グラム陰性菌外膜の構造と生理機能. エンドトキシン-新しい治療・診断・検査. (中野昌康, 小玉正智 編, 講談社サイエンティフィク), 第2章, p 8-14 (1995).
- 77) RIETSCHER, E. T., L. BRADE, B. LINDER and U. ZÄHRINGER. Biochemistry of lipopolysaccharides. in *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Molecular Biochemistry and Cellular Biology* (eds. by MORRISON, D. C. and L. RYAN, CRC Press, Boca Raton.), Volume I, Chapter 1, p 3-41 (1992).
- 78) RIETSCHER, E. T., T. KIRIKAE, F. U. SHADE, A. J. ULMER, O. HOLST, H. BRADE, G. SCHMIDT, U. MAMAT, H. -D. GRIMMECKE, S. KUSUMOTO and U. ZÄHRINGER. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology*, **187** (3-5): 169-190 (1993).
- 79) HITCHCOCK, P. J., L. LEIVE, P. H. MÄKELÄ, E. T. RIETSCHER, W. STRITTMATTER and D. C. MORRISON. Lipopolysaccharide nomenclature-past, present, and future. *J. Bacteriol.*, **166** (3): 699-705 (1986).
- 80) RAETZ, C. R. H. Biochemistry of endotoxins. *Ann. Rev. Biochem.*, **59**: 129-170 (1990).
- 81) 川原一芳. エンドトキシンの分子構造. エンドトキシン-新しい治療・診断・検査. (中野昌康, 小玉正智 編, 講談社サイエンティフィク), 第3章 p 15-27 (1995).
- 82) YU, F. and S. MIZUSHIMA. Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4. *J. Bacteriol.*, **151** (2): 718-722 (1982).
- 83) MATTSBY-BALTZER, I., P. GEMSKI and C. R. ALVING. Heterogeneity of lipid A: Comparison of lipid A types from different Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, **159** (3): 900-904 (1984).
- 84) IMOTO, M., S. KUSUMOTO, T. SHIBA, E. T. RIETSCHER, C. GALANOS and O. LÜDERITZ. Chemical structure of *Escherichia coli* lipid A. *Tetrahedron Lett.*, **26** (7): 907-908 (1985).
- 85) QURESHI, N., P. MASCAGNI, E. RIBI and K. TAKAYAMA. Monophosphoryl lipid A obtained from lipopolysaccharides of *Salmonella minnesota* R595. *J. Biol. Chem.*, **260** (9): 5271-5278 (1985).
- 86) 横地高志. エンドトキシンの活性, 概説. エンドトキシン-新しい治療・診断・検査. 中野昌康, 小玉正智 編, 講談社サイエンティフィク, 第5章1節, p 45-51 (1995).
- 87) 芝 哲夫, 楠本正一. リピドAの化学. 有機合成化学, **46** (5): 501-508 (1988).
- 88) HOLST, O. and H. BRADE. Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. in *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides, Molecular Biochemistry and Cellular Biology* (eds. by MORRISON, D. C. and J. L. RYAN, CRC Press, Boca Raton.) Volume I, Chapter 6, p 135-170 (1992).
- 89) SANDERSON, K. E., T. MACALISTER, J. W. COSTERTON and K. -J. CHENG. Permeability of lipopolysaccharide-deficient (rough) mutants of *Salmonella typhimurium* to antibiotics, lysozyme, and other agents. *Can. J. Microbiol.*, **20** (8): 1135-1145 (1974).
- 90) VAARA, M. and H. NIKAIKO. Molecular organization of bacterial outer membrane. in *Handbook of Endotoxin, Chemistry of Endotoxin* (ed. by RIETSCHER, E. T., Elsevier Science Publishers, Amsterdam.), Volume 1, Chapter, 1, p 1-45 (1984).
- 91) JANN, K. and B. JANN. Structure and biosynthesis of O-antigens. in *Handbook of Endotoxin, Chemistry of Endotoxin* (ed. by RIETSCHER, E. T., Elsevier Science Publisher, Amsterdam.) Volume 1, Chapter, 4, p 138-186 (1984).
- 92) HOLST, O., U. ZÄHRINGER, H. BRADE and A. ZAMOJSKI. Structural analysis of the heptose / hexose region of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K-12 strain W3100. *Carbohydr. Res.*, **215** (2): 323-335 (1991).
- 93) HAISHIMA, Y., O. HOLST and H. BRADE. Structural investigation on the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* rough mutant F653 representing the R3 core type. *Eur. J. Biochem.*, **203** (1): 127-134 (1992).
- 94) HAISHIMA, Y., O. HOLST and H. BRADE. Correction for Ref. 93). *Eur. J. Biochem.*, **207** (3): 1129 (1992).
- 95) VINOGRADOV, E. V., K. VAN DER DRIFT, J. E. THOMAS-OATES, S. MESHKOV, H. BRADE and O. HOLST. The structures of the carbohydrate backbones of the lipopolysaccharides from *Escherichia coli* rough mutants F470 (R1 core type) and F576 (R2 core type). *Eur. J. Biochem.*, **261** (3): 629-639 (1999).
- 96) 川原一芳, 一色恭徳. LPS (内毒素) の活性中心付近に見出された新しい化学構造. 日本細菌学雑誌, **50** (2): 451-469 (1995).
- 97) FEIGE, U., B. JANN, K. JANN, G. SCHMIDT and S. STIRM. On the primary structure of the *Escherichia coli* R4 cell wall lipopolysaccharide core. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79** (1): 88-95 (1977).
- 98) 竹田和正. ϵ^{15} フェージレセプター. 生体膜実験法 (下) (赤松 稔, 浅野 明, 安楽泰宏, 大村恒雄, 藤田道也,

- 水島昭二 企画編集, 共立出版) 蛋白質核酸酵素 1974 年 12 月号別冊, p 156-163 (1974).
- 99) DAWES, J. Characterization of the bacteriophage T4 receptor site. *Nature*, **256** (5513): 127-128 (1975).
 - 100) Prehm, P., B. JANN, K. JANN, G. SCHMIDT and S. STIRM. On a bacteriophage T3 and T4 receptor region within the cell wall lipopolysaccharide of *Escherichia coli* B. *J. Mol. Biol.*, **101** (2): 277-281 (1976).
 - 101) 徳永 徹. フェージレセプター遺伝子受容の窓口としての細菌細胞表層構造. 蛋白質核酸酵素, **17** (9): 692-703 (1972).
 - 102) LINDBERG, A. A. Bacteriophage receptors. *Ann. Rev. Microbiol.*, **27**: 205-241 (1973).
 - 103) LINDBERG, A. A. Bacterial surface carbohydrates and bacteriophage adsorption. in Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell (ed. by SUTHERLAND, I., Academic Press, London.) Chapter 8, p 289-356 (1977).
 - 104) 金ヶ崎士郎. Gram 陰性細菌の細胞表層と phage. 生化学, **50** (12): 1266-1285 (1978).
 - 105) SPENCER, J. H., E. RASSART, J. S. KAPTEIN, K. HARBERS, F. G. GROSVELD and B. GOODCHILD. The S13 genome. in The Single-Stranded DNA Phages (eds. by DENHARDT, D. T., D. DRESSLER and D. S. RAY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) p 87-101 (1978).
 - 106) GODSON, G. N., J. C. FIDDES, B. G. BARRELL and F. SANGER. Comparative DNA sequence analysis of the G4 and ϕ X174 genomes. in The Single-Stranded DNA Phages (eds. by DENHARDT, D. T., D. DRESSLER and D. S. RAY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) p 51-86 (1978).
 - 107) SINSHEIMER, R. L. Bacteriophage ϕ X174 and related viruses. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **8**: 115-169 (1968).
 - 108) BONE, D. R. and C. E. DOWELL. A mutant of bacteriophage ϕ X174 which infects *E. coli* K12 strains I. Isolation and partial characterization of ϕ XtB. *Virology*, **52** (2): 319-329 (1973).
 - 109) BONE, D. R. and C. E. DOWELL. A mutant of bacteriophage ϕ X174 which infects *E. coli* K12 strains II. Replication of ϕ XtB in tsDNA strains. *Virology*, **52** (2): 330-336 (1973).
 - 110) TAKETO, A. Host factor requirements and some properties of ϕ XtB. *Mol. Gen. Genet.*, **148** (2): 139-142 (1976).
 - 111) MATTHES, M. and D. T. DENHARDT. Comparison of restriction endonuclease *Hae* III fragments of ϕ X174, ϕ XtB, and St-1: Evidence that ϕ XtB is St-1. *Virology*, **85** (2): 626-627 (1978).
 - 112) DOWELL, C. E., H. S. JANSZ and J. ZANDBERG. Infection of *Escherichia coli* K-12 by bacteriophage ϕ X-174. *Virology*, **114** (1): 252-255 (1981).
 - 113) TAKETO, A. Effect of *dna* mutations on replication of S13, ϕ R, and ϕ Kh-1. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **23** (1): 29-35 (1977).
 - 114) JAZWINSKI, S. M., A. A. LINDBERG and A. KORNBORG. The lipopolysaccharide receptor for bacteriophages ϕ X174 and S13. *Virology*, **66** (1): 268-282 (1975).
 - 115) NNALUE, N. A., S. M. LIND, and A. A. LINDBERG. The disaccharide L- α -D-heptose 1 $\rightarrow$ 7-L- α -D-heptose 1 $\rightarrow$ of the inner core domain of *Salmonella* lipopolysaccharide is accessible to antibody and is the epitope of a broadly reactive monoclonal antibody. *J. Immunol.*, **149** (8): 2722-2728 (1992).
 - 116) FEIGE, U. and S. STIRM. On the structure of the *Escherichia coli* C cell wall lipopolysaccharide core and on its ϕ X174 receptor region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71** (2): 566-573 (1976).
 - 117) BRUCE, G. W., R. WOLLIN and A. A. LINDBERG. Interaction between phage G13 and its oligosaccharide receptor studied by equilibrium dialysis. *J. Mol. Recognit.*, **2** (1): 18-24 (1989).
 - 118) WOLLIN, R., G. W. BRUCE, P. - E. JANSSON and A. A. LINDBERG. Definition of the phage G13 receptor as structural domains of trisaccharides in *Salmonella* and *Escherichia coli* core oligosaccharides. *J. Mol. Recognit.*, **2** (1): 37-43 (1989).
 - 119) BRUCE, G. W., R. WOLLIN, S. OSCARSON, P. - E. JANSSON and A. A. LINDBERG. Studies of the binding activity of phage G13 to synthetic trisaccharides analogous to binding structures in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* C core saccharide. Correlation between conformation and binding activity. *J. Mol. Recognit.*, **4** (4): 121-128 (1991).
 - 120) JANSSON, P. - E., R. WOLLIN, G. W. BRUCE and A. A. LINDBERG. The conformation of core oligosaccharides from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides as predicted by semi-empirical calculations. *J. Mol. Recognit.*, **2** (1): 25-36 (1989).
 - 121) 山根章宏, 湯井敏文, 稲垣 稔, 柏村直樹. ϕ X174 レセプター, *Salmonella typhimurium* rfb の LPS 先端糖鎖の配座解析. 松阪大学女子短期大学部論叢, **31**: 49-62 (1993).
 - 122) 山根章宏, 湯井敏文, 柏村直樹. Conformational analysis of O- α -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2) - α -D-galactopyranoside. 松阪大学女子短期大学部論叢, **35**:

- 9-14 (1997).
- 123) YAMANE, A., T. YUI, M. INAGAKI, S. NISHIKAWA and N. KASHIMURA. Conformation analyses of ϕ X174 receptor oligosaccharides of LPS by molecular mechanics. Proceedings of the XIXth International Carbohydrate Symposium, San Diego, AP062 (1998).
- 124) 山根章宏, 湯井敏文, 稲垣 稔, 柏村直樹. MM3 によるレセプター糖鎖の立体配座の検討. 日本農芸化学会 1999 年度大会要旨集, 日本農芸化学会誌, 73: 283 (1999).
- 125) ILAG, L. L., J. K. TUECH, L. A. BEISNER, R. A. SUMRADA and N. L. INCARDONA. Role of DNA-protein interactions in bacteriophage ϕ X174 DNA injection. *J. Mol. Biol.*, **229** (3): 671-684 (1993).
- 126) MANO, Y., T. KAWABE, T. KOMANO and K. YAZAKI. Involvement of a cell envelope component of *Escherichia coli* in the early stages of infection with bacteriophage ϕ X174. *Agric. Biol. Chem.*, **46** (8): 2041-2049 (1982).
- 127) SIEGEL, J. E. D. and M. HAYASHI. ϕ X-174 bacteriophage structural mutants which affect deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Virol.*, **4** (4): 400-407 (1969).
- 128) JAZWINSKI, S. M., A. A. LINDBERG and A. KORNBERG. The gene H spike protein of bacteriophages ϕ X174 and S13 I. Functions in phage-receptor recognition and in transfection. *Virology*, **66** (1): 283-293 (1975).
- 129) JAZWINSKI, S. M., R. MARCO and A. KORNBERG. The gene H spike protein of bacteriophages ϕ X174 and S13 II. Relation to synthesis of the parental replicative form. *Virology*, **66** (1): 294-305 (1975).
- 130) CHASE, C. D. and R. H. BENZINGER. Transfection of *Escherichia coli* spheroplasts with a bacteriophage Mu DNA-protein complex. *J. Virol.*, **42** (1): 176-185 (1982).
- 131) HARSHEY, R. M. and A. I. BUKHARI. Infecting bacteriophage Mu DNA forms a circular DNA-protein complex. *J. Mol. Biol.*, **167** (2): 427-441 (1983).
- 132) GLOOR, G. and G. CHACONAS. The bacteriophage Mu N gene encodes the 64-kDa virion protein which is injected with, and circularizes, infecting Mu DNA. *J. Biol. Chem.*, **261** (35): 16682-16688 (1986).
- 133) KRAHN, P. M., R. J. O'CALLAGHAN and W. PARANCHYCH. Stages in phage R17 infection VI. Injection of a protein and RNA into the host cell. *Virology*, **47** (3): 628-637 (1972).
- 134) JAZWINSKI, S. M., R. MARCO and A. KORNBERG. A coat protein of the bacteriophage M13 virion participates in membrane-oriented synthesis of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **70** (1): 205-209 (1973).
- 135) UHLMANN, A. and K. GEIDER. Interaction of DNA with DNA binding proteins III. Infectivity of protein-complexed phage fd DNA in *Escherichia coli* spheroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **474** (4): 639-645 (1977).
- 136) 廣川秀夫. DNA-蛋白質複合体の感染性: ファージ ϕ 29 のトランスフェクション. 蛋白質核酸酵素, **20** (1): 26-41 (1975).
- 137) GODSON, G. N. Comparative DNA-sequence analysis of the G4 and ϕ X174 genomes (Appendix II). in *The Single-Stranded DNA Phages* (eds. by DENHARDT, D. T., D. DRESSLER and D. S. RAY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.) p 671-695 (1978).
- 138) WEISBEEK, P. J., J. H. VAN DE POL and G. A. VAN ARKEL. Mapping of host range mutants of bacteriophage ϕ X174. *Virology*, **52** (2): 408-416 (1973).
- 139) INAGAKI, M., K. MAEYAMA, H. HANDA, A. TANAKA, S. KARITA, S. NISHIKAWA and N. KASHIMURA. Evaluation of specific binding of H protein of bacteriophage ϕ X174 fused with maltose-binding protein toward receptor lipopolysaccharides. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.*, **4** (1): 59-64 (2000).
- 140) SUZUKI, R., M. INAGAKI, S. KARITA, T. KAWAURA, M. KATO, S. NISHIKAWA, N. KASHIMURA and J. MORITA. Specific interaction of fused H protein of bacteriophage ϕ X174 with receptor lipopolysaccharides. *Virus Res.*, **60** (1): 95-99 (1999).
- 141) INAGAKI, M., A. TANAKA, R. SUZUKI, H. WAKASHIMA, T. KAWAURA, S. KARITA, S. NISHIKAWA, and N. KASHIMURA. Characterization of the binding of spike H protein of bacteriophage ϕ X174 with receptor lipopolysaccharides. *J. Biochem.*, **127** (4): 577-583 (2000).
- 142) KAWAURA, T., M. INAGAKI, S. KARITA, M. KATO, S. NISHIKAWA and N. KASHIMURA. Recognition of receptor lipopolysaccharides by spike G protein of bacteriophage ϕ X174. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64** (9): 1993-1997 (2000).
- 143) NEW-ENGLAND-BIOLABS INC. Protein Fusion & Purification System. Expression and Purification of Proteins from Cloned Gene. New England Biolabs Instruction Manual version 3.01, Beverly (1993).
- 144) QIAGEN INC. The QIAexpressionist -A hand book for high-level expression and purification of 6 $\times$ His-tagged proteins. QIAGEN INC., Hilden (1999).
- 145) GUPTA, R. K., W. EGAN, D. A. BRYLA, J. B. ROBBINS and S. C. SZU. Comparative immunogenicity of conjugates composed of *Escherichia coli* O111 O-specific polysaccharide, prepared by treatment with acetic acid

- or hydrazine, bound to tetanus toxoid by two synthetic schemes. *Infect. Immun.*, **63** (8): 2805-2810 (1995).
- 146) MÜLLER-LOENNIES, S., O. HOLST and H. BRADE. Chemical structure of the core region of *Escherichia coli* J-5 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, **224** (2): 751-760 (1994).
- 147) SCHMIDT, G., B. JANN and K. JANN. Immunochemistry of R lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. Different core regions in the lipopolysaccharides of O group 8. *Eur. J. Biochem.*, **10** (3): 501-510 (1969).
- 148) SCHMIDT, G., B. JANN and K. JANN. Immunochemistry of R lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. Studies on R mutants with an incomplete core, derived from *E. coli* O8: K27. *Eur. J. Biochem.*, **16** (2): 382-392 (1970).
- 149) INAGAKI, M., H. WAKASHIMA, A. TANAKA, T. KAWAURA, R. SUZUKI, S. KARITA, S. NISHIKAWA and N. KASHIMURA. Characterization of lipopolysaccharide-binding of spike H protein of bacteriophage ϕ X174. Proceedings of the 20th International Carbohydrate Symposium, Hamburg, Germany, p 281 (2000).
- 150) KAWAURA, T., M. INAGAKI, S. KARITA, A. TANAKA, S. NISHIKAWA and N. KASHIMURA. Recognition of lipopolysaccharide receptor by spike G protein of bacteriophage ϕ X174. Proceedings of the 20th International Carbohydrate Symposium, Hamburg, Germany, p 303 (2000).
- 151) ILAG, L. L., R. MCKENNA, M. P. YADAV, J. N. BEMILLER, N. L. INCARDONA and M. G. ROSSMANN. Calcium ion-induced structural changes in bacteriophage ϕ X174. *J. Mol. Biol.*, **244** (3): 291-300 (1994).
- 152) MCKENNA, R., B. R. BOWMAN, L. L. ILAG, M. G. ROSSMANN and B. A. FANE. Atomic structure of the degraded procapsid particle of the bacteriophage G4: Induced structural changes in the presence of calcium ions and functional implications. *J. Mol. Biol.*, **256** (4): 736-750 (1996).