

T₄プロヘッドの試験管内再集合

加藤 尚子

(一) バクテリオファージの形態形成について

バクテリオファージというのは細菌を宿主とするウイルスである。バクテリオファージの研究は近年の分子生物学の発展に大きな功績を残した。遺伝子の構造や働き、解明に多く用いられたのは、その一生が三〇分から一時間程で終る便利さのみならず、短時間に均一な標品を大量に得ることができることからきている。ゆえに遺伝子解析にしても一億分の一以下の確率で起るような変異すらもとらえることができる。

分子生物学の発展は遺伝子の構造を明らかにしただけでなく、遺伝情報がRNAからタンパク質へと伝わる過程を明らかにした。遺伝情報はタンパク質に実現されて初めてその意味をもつのである。ファージの形態形成について言えば種々のタンパク質が、どのような経路を通じて組み立てられるのかを明らかにし、最終的にはそれらのタンパク質のもつ一次・二次構造にまでさかのぼってタンパク同志の相互作用を明らかにすることによって普遍性をもつように思われる。

(二) バクテリオファージT₄について

バクテリオファージT₄の構造は遺伝子である核酸(DNA)とそれらを保護するタンパク質の殻(頭部)からできている。T₄は大腸菌を宿主とし宿主に吸着するための器官である尾部をもっている。T₄の頭部は縦長の二十面体で12の頂点をもち、主要タンバ

ク質のgp23(遺伝子23産物)とgp24から構成されている。そして頭部の内にはDNAの他に内部タンパク質を含んでいる。尾部についてはここでは関係がないので省略する。

(三) T₄プロヘッドの形態形成の研究経過

頭部形態形成の研究から、まず頭部前駆体ができ、その中にDNAが包み込まれることにより頭部が完成するということが明らかにした。しかし頭部前駆体(プロヘッド)がどのようにして構築されるのかという問題が残されていた。

T₄頭部が頭部殻タンパク質のみでは構築できないこと、即ち頭部殻タンパク質のもつ自己集合能だけではできないことを多くの事実が示していた。例えば遺伝子20や22の突然変異体感染菌では長い筒状の頭(ポリヘッド)になる。遺伝子21や24が変異していると頭部前駆体が貯まる。宿主の突然変異体(E. coli gro Eあるいは、*hcb3*等)やT₄遺伝子31突然変異体感染菌では頭部主要タンパク質が大きなたまりになる等である。これらの事実は頭部形成に関与するこれらの遺伝子産物が組織的・経時的に働くことにより初めて頭部形成が行われる事を示している。

T₄頭部は少し縦長の二十面体になっているが遺伝子23の変異で正二十面体の頭部を多く作るものが見つかっている。この変異体感染菌ではプロヘッドが正二十面体になっており、この事はプロヘッドの段階ですでに頭部の形・長さは決ってしまっているということを示す。以上の事からプロヘッドの形態形成の研究は、どのような経路でプロヘッドが構築されるのか、そしてプロヘッドの形・長さはどのような機構によって決まるのかということが明らかにされねばならない。

(四) T₄プロヘッドの構造

T₄プロヘッドは20の面と12の頂点をもっている。各面はgp23から構成され、一つの頂点である尾部との連結部位(コネクター)はgp20、他の頂点はgp24で構成されている。プロヘッドの内部にはcoreがあり、gp22, gp1PI~III, gp58, gp57で構成されている。二十面体構造から幾何学的に言えることは垂直な軸に対して上下二つの水平面上に五回対称性をもつ五本の軸が各頂点に向ってあるということである。

(iv) T₄プロヘッドの試験管内再集合

(a) gp20複合体の分離

形態形成の研究において構造体を分離してからバラバラにして後、再び試験管内で再集合する実験は集合過程やタンパク質の機能・役割を明らかにする上で非常に有効な方法である。T₄プロヘッドを分離した後、個々のタンパク質に解離した混合液(プロヘッド・タンパク混合液)にMg²⁺を加えて室温で一晩おくと、プロヘッドが再集合した。van DrielとCoutureはcoreタンパク混合液に、プロヘッド・タンパク混合液を分画して得られたgp20を多く含む分画を加えるとcoreが再集合することを報告した。

これらの結果は、gp20がプロヘッドやcoreの集合の初動を起させる働きをもつもの(イニシエーター)であることを示している。しかしgp20を精製できていなかったため疑問が残された。

その後Calendeyその他は、coreタンパクを精製して再集合実験を行うとpolycoreと呼ばれる長いcoreができたことを報告した。真のcoreを作るために彼らは精製したgp20をcoreタンパク混合液に加えたところだがgp20がそれ自身でかたまりを作ってしまったので何の働きもなかった。

私達は、T₄感染菌から活性のあるgp20を分離することを試み

た。T₄の宿主である大腸菌の変異体の中で、groE⁻やB₃-1と呼ばれるものは、T₄感染後タンパク合成は正常に起るがT₄頭部の形成が初期の段階で阻止されgp23がかたまりとなって菌内に貯まることが観察されていた。頭部形成の初期段階で阻止されているということはイニシエーターが使われずに貯まっていることが期待できる。大腸菌B₃-1にT₄突然変異体(遺伝子10, 18, 22, 23)を感染し、感染菌を分画することにより活性のあるgp20を精製することができた。精製されたgp20は他に二つのタンパク質と複合体を作っていた。コネクターは12個のgp20がリング状に集ったもので六回対称性をもっている。フーリッジに結合した状態ではこのgp20リングはさらにneckタンパク質(gp13, gp14等)が結合し首の所にウィスカー(gp20c)と呼ばれる六本の繊維を結合している。分離されたgp20複合体がもっている二つのタンパク質はそれらの分子量と、又gp20複合体の電子顕微鏡によってgp20リングに繊維状のものが六本結合していることが観察されたことにより、gp20cとgp13であることが示唆された。

(b) プロヘッドの試験管内再集合

低塩濃度と低温の条件にするとプロヘッドはこわれて個々のタンパク質の混合液が得られる。この混合液にMg²⁺とポリエチレングリコールを加えて室温で一晩おくとcoreを含むプロヘッドができた。同じ条件でgp20複合体を加えると長い筒状のプロヘッドの代わりにプロヘッド様の構造ができた。この再集合したプロヘッド様構造は各頂点に繊維が見られ、このことから各頂点にgp20複合体が結合していることが示唆された。この結果はプロヘッドの基部になる頂点のみgp20で他の頂点はgp24で構成されているということこれまでの考え方と大きく異なる。

そこで、 T_4 感染菌内で合成された本来のプロヘッドについて各頂点に $gp20$ をもっているかどうかを抗 $gp20$ 血清との抗原抗体反応を使って調べた。予想通りプロヘッドの各頂点が抗 $gp20$ 血清と反応した。 T_4 プロヘッドは少し縦長なので基部と他の頂点をその位置から区別できる。基部と他の頂点の別なくランダムに抗体が結合していることがわかり、 T_4 プロヘッドは各頂点に $gp20$ をもっていることが確かめられた。これらの結果は $gp20$ 複合体はプロヘッド形成のイニシエーターとなりうるだけでなく又、頂点形成にも必要であることを示している。

(c) core 試験管内再集合

van Driel と Couture は分離精製した core タンパクに $gp20$ を多く含む分画を加えると core ができたことを報告した。このことからプロヘッド形成において、まず core ができそのまわりを $gp23$ が囲うことによりプロヘッドが形成されるという考え方が生まれた。しかし一方、Traub 等は遺伝子 20 突然変異体の中で core を作るができるものがあることを見つけた。この結果は core 形成に $gp20$ が必要でないということを意味している。これらの事から $gp20$ や core の役割について意見がわかれていた。

分離精製された core タンパクに $gp20$ 複合体を加えて Mg^{++} 、ポリエチレングリコール存在下で一晩室温に放置したところ、五回対称性をもつ星型の構造が観察された。この構造の各先端には繊維が結合しており、この事からこの構造の先端には $gp20$ 複合体が結合していることが示唆された。再集合したプロヘッドの各頂点に $gp20$ が結合していることが観察されたが、この事実と再集合した core の先端に $gp20$ が結合している結果とはよく呼応するものである。即ちファージ頭部は二つの平行面に五回対称的

をもつ 10 の頂点と垂直線上に二つの頂点をもっている。五回対称性の星型構造が二つ垂直に結合するように core が形成されると考えると星型構造の先端にある $gp20$ 複合体が再集合したプロヘッドの各頂点にある $gp20$ 複合体に当ることをうまく説明できる。

(d) T_4 プロヘッド集合モデル

以上の結果をまとめてプロヘッド集合経路を作った。簡単に説明すると膜に結合したものと、していないものの両方で $gp20$ に core タンパクが結合して星型構造をつくる。二つの星型構造が膜上で結合して core を作る。おそらく $gp20$ を起点にして $gp23$ が集合して各頂点に $gp20$ 複合体をもつものができる。 $gp24$ が引き金となって膜に結合した $gp20$ を残して他の $gp20$ 複合体が離れる。 $gp24$ が代わりに頂点に入り、それがタンパク質の切断を引き起し、タンパク質を切断したプロヘッドは膜から遊離して細胞質中に移動する。

プロヘッドの長さは二つの星型の距離によって決まる。もちろん縦と横の長さの比によって二十面体ができる場合とできない場合がある。 $gp23$ の変異によって正二十面体になるのは、変異した $gp23$ の集合が少し変化した結果と考えられる。即ち二つの星型の間の距離は $gp23$ によって変化するものである。巨大頭部を作る場合は星型が二つ以上結合したものと考えられる。

プロヘッドの形がいびつに変化したものが遺伝子 22 や 68 の突然変異感染菌で見つかっている。これらは core 遺伝子の変異である。星型の軸の長さが変化したことにより容易にこれらの変異を説明することができる。又、これらの遺伝子の変異は尾部がたくさん結合したファージを作ることが知られている。この現象も core 遺伝子の変異が $gp20$ の離脱をおさえたとして容易に説明できる。