

T3 ファージの感染初期に働く ファージ頭部内に含まれるたんぱく質

加 藤 尚 子

はじめに

Kornberg (1974) は、T4 ファージがバクテリアに感染する初期過程においてファージ DNA がバクテリアの中に注入されるのを助けたり、ファージ DNA 合成の始まりを助けるためのたんぱく質をパイロットたんぱく質と名づけた。パイロットたんぱく質は頭部と尾部を結ぶコネクターに結合することによって、DNA の端に結合しており、DNA が注入される時に DNA と一緒にバクテリアの中に入るものと考えられている。T4 のパイロットたんぱく質の遺伝子 2 や 64 のアンバー突然変異株を su^- 菌に感染すると、外見的には正常ファージと変わらないが感染性のない粒子が産出される。これらの欠損粒子は *E. coli* に正常に吸着し、バクテリアを殺すが、細胞質に入った DNA は壊れてしまうことが観察されている。(Granboulan *et al.*, 1971; Silverstein and Goldberg, 1976a, b)。しかしバクテリアが *recBC* (exonuclease V) であれば DNA が壊れないことが示された。

同じ様な働きをするたんぱく質が T4 ファージ以外でも報告されている。RNA ファージである R17 では、パイロットたんぱく質の働きをする Aたんぱく質が F-ピラーに結合して RNA の注入を助ける働きをすることが報告されている (Wong and paranchych, 1976)。またバクテリオファージ T5 においても、正常に注入されなかったファージ DNA は、periplasmic nuclease によって壊されることが報告されている (Labadan and Legault-Demare, 1974)。T7 ファージにおいてはバクテリアの exonuclease V (*recB*, *C DNase*) を阻害するたんぱく質が産生され、このたんぱく質はたんぱく合成阻害剤のクロラムフェニコールの存在や、遺伝子 1 の突然変異株では、産生されないことが報告されている (pacumbaba and Center, 1975)。

T3 ファージと近縁の T7 や T3 の遺伝子 13, 14, 15, 16 の突然変異株感染菌において、T4 と同様に外見上は正常な感染性のない粒子が産出され、これらの遺伝子がパイロットたんぱく質をコードしていると考えられる。T7 ファージにおいて、Serwer (1976) はプロヘッドや DNA の抜けた空頭に見える core 構造が gp13, gp14, gp15, gp16 で構成されていることを示した。また Roeder and Sadowski (1977) はプロヘッドの電子顕微鏡観察によって、core 形成に gp8, gp14, gp15, gp16 が関係していることを示した。gp8 はコネクターたんぱく質であるので、T7 ファージにおいても T4 と同様にパイロットたんぱく質とコネクターの結合が考えられる。実際、Serwer (1979) は円筒状の core 構造から放射状に頭部に向かって繊維状の構造が伸びていることを報告している。一方、T7 のバクテリアへの DNA の転移は 2 段階で行われ、まず DNA の左端から数百塩基対のみが注入され、それを元にして宿主の RNA ポリメラーゼによる転写が起こり、その後に残りの DNA が注入されることが報告されている。しかし最近、この転写がなくても遺伝子 16 の変異があると DNA の転移が起こることが見つかった (Garcia and Molineux, 1996)。

このように gp13, gp14, gp15, gp16 はパイロットたんぱく質としての役割を持っていることが示されているのであるが、その働きはまだよくわかっていない。そこで T3 ファージの遺伝子 13~16 の欠損により産出される欠損粒子の感染初期過程を分析することにより、これらのたんぱく質の働きを調べた。これらの欠損粒子はバクテリアに吸着して DNA を注入するが、killing やファージのたんぱく合成、DNA 合成がなく、また注入された親 DNA の膜への結合が見られないことがわかった。親 DNA の膜への結合が T3 ファージの増殖過程に必要であり、この過程の確立に gp13~16 が働いていることを示唆している。T3 ファージが感染した場合、親 DNA は膜に結合し、感染初期には DNase I に非感受性であるが、ファージ DNA 合成が始まる頃には徐々に感受性になる。それに反して、娘 DNA は同じく膜に結合しているが DNase I に感受性である。そしてこの膜結合 DNA がファージ頭部に取り込まれていくが、頭部ができない突然変異株の場合には、膜フリーの分画に行くことがわかった。

実験方法

(1) dp の分離精製

Escherichia coli B₃₋₁ に30℃で遺伝子12, 13, 14, 15, 16のアンバー突然変異株を各々バクテリア1に対して5の割合で感染し、感染後40分に4000 rpm (回転/分) の遠心で集菌した。バクテリアをファージ緩衝液に分散した後、クロロホルムで溶菌した。6000 rpmの遠心でバクテリアの膜などを沈澱して除いた後、CsCl ステップ密度勾配遠心法 (36000 rpm, 80分間) によってできたファージバンドを注射器で分離し、透析によってCsClを除いた。dp の数はOD₂₆₀ を測定してファージとの比較から割り出した。³H-チミジン標識の dp を作成する場合は、遺伝子13, 14, 15, 16のアンバー突然変異体のファージを感染後10分に³H-チミジンを1 μ C添加し、同様にして dp を分離した。

(2) dp の宿主への吸着

³H-チミジンで標識された DNA を持つ T3w ファージと dp12, dp13, dp14, dp15, dp16 を *E. coli* B₃₋₁ にバクテリア1あたり5の割合で感染し、5分後に感染菌を4000 rpm で遠心して、上澄み液と沈澱に分画した。その沈澱を Tris, EDTA, sucrose を含む液にけん濁して、更に4000 rpm で遠心して、上澄み液と沈澱に分画した。沈澱に存在するカウントをバクテリアに吸着したファージあるいは dp と見なした。

(3) DNA 合成

DNA 合成を止めるために90秒間紫外線照射した *E. coli* B₃₋₁ に30℃で T3w ファージあるいは dp をバクテリア1に対して5の割合で感染した。感染する1分前にデオキシアテノシン200 μ g/ml と³H-チミジン2 μ C/ml を添加し、ファージあるいは dp 感染後、5分ごとにサンプルを取った。サンプルの0.3M, TCA 不溶性分画のカウントを測定した。

(4) DNA の膜結合

E. coli B₃₋₁ に³H-ラベルされた DNA を持つ T3w ファージを30℃で感染し2分, 8分, 20分後に4000 rpm の遠心で集菌した。感染菌を1mlの20%蔗糖, 0.1M Tris, 5mM EDTA に分散して再度遠心して集菌し, 1mlの0.1M Tris, 0.005M EDTA に分散して後, 100 μ g/ml リゾチームを加え0℃で30分間置いた。その後, 0.5%ブリッジ58を加えて30℃で10分間置く

ことにより溶菌した。DNase I で処理する場合は、これらの溶菌液に0.01M, マグネシウムと $1 \mu\text{g/ml}$, DNase I を加えて、 30°C , 10分間静置した後20mM EDTA を添加した。この溶菌液を ^{32}P で DNA をラベルしたマーカーフェージとともに60%の蔗糖を底に敷いた5~20%の蔗糖密度勾配の上に乗せて、23000 rpm, 30分間遠心した後分画し、0.3M の TCA に不溶性の分画をカウントした。dp の親 DNA を調べる場合は、感染後5分に集菌して同様に実験した。

膜結合親 DNA あるいは、DNase I 抵抗性の膜結合親 DNA 分析実験では、これらの DNA を膜から離すために、溶菌液を0.2% SDS を添加して 65°C で10分間処理してから 1mg/ml のプロナーゼを添加して 30°C で一晩静置した後、 ^{32}P -T3 DNA マーカーとともに蔗糖密度勾配遠心を上に述べたように行った。

娘 DNA の膜への結合を調べる場合は、90秒間紫外線照射した *E. coli* B₃₋₁ にバクテリア 1 に対してフェージ10の割合で T3w あるいは T3amHM56 (遺伝子9) フェージを 25°C で感染後、20分に $5 \mu\text{C/ml}$ の ^3H -チミジンを添加し、1分後に $200 \mu\text{g/ml}$ のデオキシアデノシンを入れてパルスラベルし、9分、19分後に集菌した。後の処理は親 DNA の場合と同様に行った。

膜結合 DNA およびフリー DNA を分析する場合は、 25°C で感染後、26分から28分に ^3H -チミジンでパルスラベルして、すぐに集菌し、同様にして分画した。この分画3と分画25を0.1M Tris, 10mM EDTA, 0.2M NaCl 溶液でそれぞれ10倍、あるいは2倍に薄めて後、0.2% SDS を添加後 65°C で10分間処理した後、 1mg/ml のプロナーゼを添加して 30°C で一晩静置し、それらをマーカーの ^{32}P -DNA とともに10~30%蔗糖密度勾配法で32000 rpm, 150分間遠心して後分画した。

結 果

(1) 欠損粒子の分離とそれらの性質

T3 フェージの遺伝子, 13, 14, 15, 16のアンバー突然変異株感染菌において、感染性のない欠損粒子 (defective particle, 以後 dp) が産生される。これらの dp を各々の感染菌から分離精製して、電子顕微鏡で観察した。図1に遺伝子13の欠損菌から分離した dp を示す。図には示されていないが遺

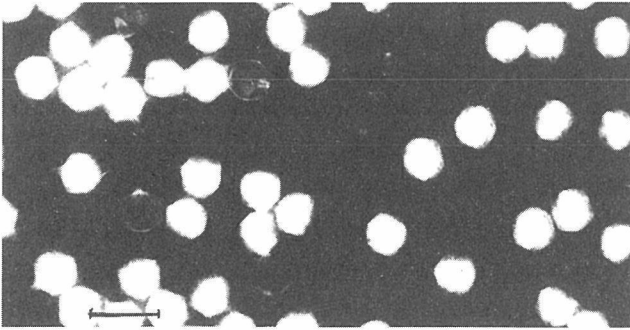


図1 dpの電子顕微鏡写真

遺伝子13感染菌から分離精製した dp13 粒子を1%ウラニールアセテートでネガティブ染色して電子顕微鏡で観察した。バーは0.1 μ mを表す。

伝子14, 15, 16の dp も全く同じ形態をしていた。これらの dp の外見は正常フェージと全く同じであり、電子顕微鏡ではその欠損を見ることはできなかった。

dp のたんぱく組成をアクリルアミド電気泳動法により調べた。図2に dp のたんぱく組成を示す。すべての dp において、尾部たんぱく質 gp11 (遺伝子11のたんぱく質) と gp12, 尾部繊維たんぱく質 gp17 が存在していることを示している。図2 a の電気泳動パターンでは gp8 と gp17 が同じ位置に来ているので gp17 の存在がわからないが、他の電気泳動では gp8 と gp17 が別のバンドになり、これらの dp が gp17 を含んでいることが示されている (未発表データ)。gp13, gp14, gp15, gp16 はフェージ構造たんぱく質であり、各々の dp は遺伝子の欠損に応じたたんぱく質を欠損している。dp13 は gp13 を、dp14 は gp14 を欠損しているが、dp15 と dp16 は gp15 と gp16 の両たんぱく質を欠損している。dp16 の場合は gp15 を少し含んでいるように見えるがフェージに比べると少ない。gp15 と gp16 は両方存在することにより安定して存在できるのかもしれない。gp14 と gp13 の間にフェージには含まれないかなり濃く染まるたんぱく質が存在しているが、これらのたんぱく質については今のところ何かはわからない。

図2 b は遺伝子3, 8, 13, 14, 15, 19のアンバー突然変異株感染菌から分離したプロヘッドのたんぱく組成を示す。遺伝子15欠損のプロヘッド(15⁻プロヘッド)は gp8, gp15, gp16 を欠損している。gp15, gp16 が gp8 の

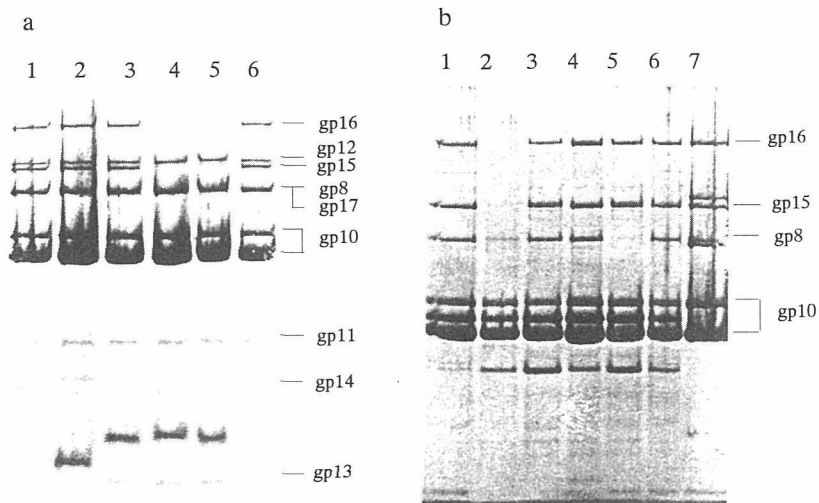


図2 dp およびプロヘッドのたんぱく組成

分離精製したファージ, dp およびプロヘッドをアクリルアミド電気泳動法で分析した。

- a. 1) T3w ファージ, 2) dp13, 3) dp14, 4) dp15, 5) dp16, 6) T3w ファージ
 b. 1) 19⁻プロヘッド, 2) 15⁻プロヘッド, 3) 14⁻プロヘッド, 4) 13⁻プロヘッド, 5) 8⁻プロヘッド, 6) 3⁻プロヘッド, 7) T3w ファージ

安定化に働いている可能性を示唆している。

(2) dp のバクテリアへの吸着

dp が増殖過程のどの段階で阻害されているのかを調べるために, まずバクテリアへの吸着がうまくいっているのかを調べてみた。³H-チミジンで DNA を標識された dp を調整した。³H ラベルの dp を大腸菌 *E. coli* B₃₋₁ に 37°C で感染し, 5 分後に毎分 4000 回転の遠心でバクテリアを沈澱し, 沈澱したバクテリアとその上澄み液に含まれる ³H の放射能のカウントを測定した。表 1 にその結果を示す。バクテリアとともに沈澱した分画のカウントはバクテリアに吸着したファージおよび dp と考えられる。コントロールとして T3w ファージと宿主への吸着に必要な尾部を欠損している dp12 を用いた。dp13~16 はファージに比べると 1/2~1/8 ほどの吸着しか示しておらず, 宿

表1 欠損粒子 (dp) のバクテリアへの吸着

	A	B	A-B	%*	C	D	%**	吸着
T3w	2634	660	1974	74.9	332	2538	96.4	+
dp12	3390	3618	0	0	290	66	1.9	-
dp13	2827	2367	460	16.1	448	780	27.3	+
dp14	2440	1201	1239	50.8	405	1052	43.1	+
dp15	2509	2207	302	12.0	267	305	12.2	+
dp16	2440	1931	509	20.9	422	536	22.0	+

³H-チミジンで標識された DNA を持つ T3w ファージと dp12, dp13, dp14, dp15, dp16 を大腸菌 B₃₋₁ に感染し、5 分後に感染菌を遠心して、上澄み液と沈澱に分画した。その沈澱を Tris, EDTA, sucrose を含む液にけん濁して、更に遠心して、上澄み液と沈澱に分画した。A は遠心する前の感染菌液のカウント、C は最初の遠心後の上澄み液のカウント、C は 2 回目の遠心での上澄み液のカウント、D はその沈澱のカウントを cpm で示している。dp12 は遺伝子 12 の欠損ファージ感染菌から得られたもので、尾部が欠損しているためにバクテリアへの吸着ができない欠損粒子である。

* バクテリアへの吸着率を A に対する A-B のカウントの割合で示している。

** バクテリアへの吸着率を A に対する D のカウントの割合で示している。

主への吸着がかなり悪いが、dp12 に比べると吸着していることを示している。バクテリアとともに沈澱した分画を蔗糖を含む Tris-EDTA に分散した後、毎分 4000 回転、5 分間の遠心をして、その上澄み液と沈澱に分画した。表 1 に示すように、バクテリアとともに沈澱したファージおよび dp は洗浄しても安定にバクテリアに吸着している。dp の吸着の割合はファージに比べるとかなり悪いが、バクテリアへの吸着ができない尾部の欠損粒子である dp12 に比べると安定に吸着していると考えられる。

(3) dp の宿主殺し (killing)

大腸菌 1 に対して T3 ファージを 5 の割合で感染すると 5 分後には大腸菌の生存率は 1 万分の 1 になっていた。dp の killing 活性を調べた。dp13, 14, 15, 16 いずれの dp も大腸菌 1 に対して 10 の割合で感染した場合でも 10 分後の大腸菌の生存率は 100% であった。dp には killing 活性はないものと思われる (未発表データ)。

(4) T3 ファージと dp の DNA 合成とたんぱく合成

紫外線照射をして宿主の DNA 合成を止めた大腸菌 B₃₋₁ に T3 ファージおよび dp13, dp14, dp15, dp16 をそれぞれ感染し、それらの DNA 合成

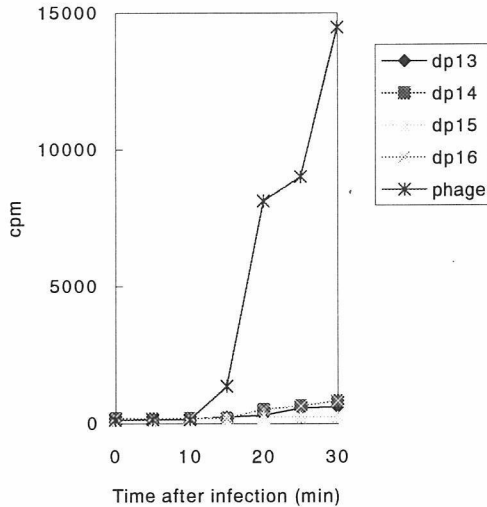


図3 ファージおよび dp の DNA 合成

紫外線照射して DNA 合成を止めた *E. coli* B₃₋₁ にファージあるいは dp を感染して ³H-チミジンの取り込みにより DNA 合成を測定した。

を ³H-チミジンの取り込みによって調べた。図3に示されているように T3 ファージを 30℃ で感染後 10 分に DNA 合成が開始し、30 分後まで続いている。これに反して、4 つの dp はすべて全く DNA 合成が行われていないことを示している。dp を感染後 ³H-ロイシンの取り込みによって dp のたんぱく合成をポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定したが、DNA 合成と同様に全くたんぱく合成は見られなかった (未発表データ)。

(5) 親 DNA の膜への結合

a) dpDNA の膜への結合

T7 ファージにおいて、バクテリアに注入された親 DNA はバクテリアの膜に結合することが報告されている。この T7DNA-膜複合体をブリッジ 58 で処理すると膜のリピッドの 95% が除かれるが、DNA は膜に結合した状態であった (Hiebsch and Center, 1977)。T3 ファージや dp においても親 DNA が膜に結合して複合体を作るのかどうかを検討した。

宿主に吸着した dp がその DNA を宿主内に注入するのかどうか、また注

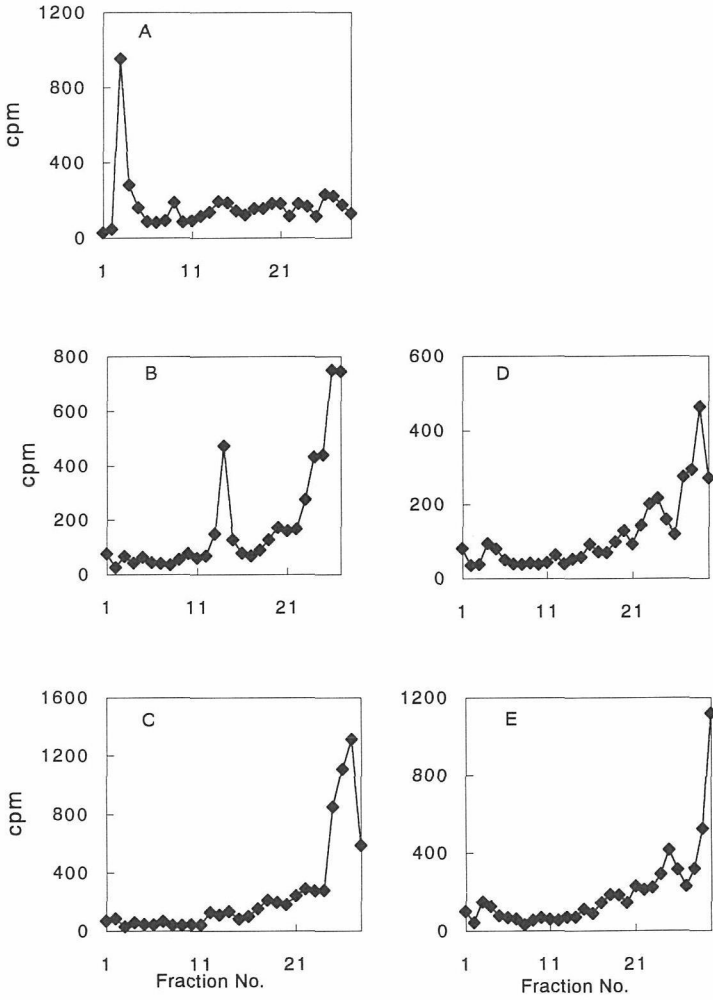



図4 親 DNA のバクテリア膜への結合

^3H -チミジンで標識された DNA を持つ T3w ファージあるいは dp の親 DNA の膜への結合を調べた。

A) T3w ファージ, B) dp13, C) dp14, D) dp15, E) dp16

入したとすれば親 DNA がその後どのような運命をたどるのかを見るために、 ^3H -チミジンで DNA を標識された dp を作成した。 ^3H -dp を 30°C で、宿主に感染後 5 分にバクテリアを遠心で集めて、洗浄後バクテリアを溶解した。溶菌液を蔗糖密度勾配遠心法で分画して、 ^3H のカウントを測定した。図 4 にその結果を示している。dp と同じようにして得た T3 ファージの親 DNA は非常に早く沈澱し、底の分画 (1~5) に存在しており、膜に結合しているものと思われる (図 4 A)。この分画を電子顕微鏡で観察すると膜の破片が見られ、DNA が結合した膜の破片も存在している。ところが dp の親 DNA はどれも膜分画には存在せず一番上の分画 (23~29) にある。dp13 にはファージの分画 (13~15、この分画がファージ分画であることは図 5 D, E, F のファージ・マーカーで示されている) にピークが見られることから、DNA 注入がうまくいっていない様に思われるが、何度かの実験の結果ではこのピークはないことも多いので dp13 が特に DNA の注入が悪いというわけでもないと思われる。この結果は dp の親 DNA は宿主の中に注入されるが膜に結合できないことを示している。

b) T3 ファージの親 DNA の膜への結合

^3H -チミジンで DNA を標識した T3 ファージを 30°C で大腸菌に感染して、ファージの親 DNA が感染後どのような運命をたどるのか、また膜結合 DNA がどのような性質を持っているのかについて調べた。 ^3H -ファージを大腸菌に感染後 2 分、8 分、20 分にバクテリアを遠心で集め、リゾチームとブリッジ 58 でバクテリア膜を溶解した後、70% 蔗糖のクッション上の 5-20% 蔗糖密度勾配遠心法で分画した。図 5 はその結果を示す。マーカーとして ^{32}P で DNA を標識したファージは  で示されている。バクテリア膜に結合している親ファージ DNA は早く沈澱する分画 (分画 No. 1~10) に存在し、ファージ粒子は分画 No. 15~20 に、フリーの親 DNA は分画 No. 25~30 に存在している。2 分に見える膜分画とファージ分画の間のピークは図 5 D に示すように DNase I 処理したものが膜分画にいつているので、たぶん膜分画と同じものではないかと思われる。膜分画にある親 DNA は感染後 20 分になっても変化せずにそのまま残っている。感染後 2 分、8 分、20 分に見られる親 DNA を DNA 分解酵素 DNase I で処理して分画したものがそれぞれ D, E, F に示されている。感染後 2 分では分画 No. 25~30 のピークは

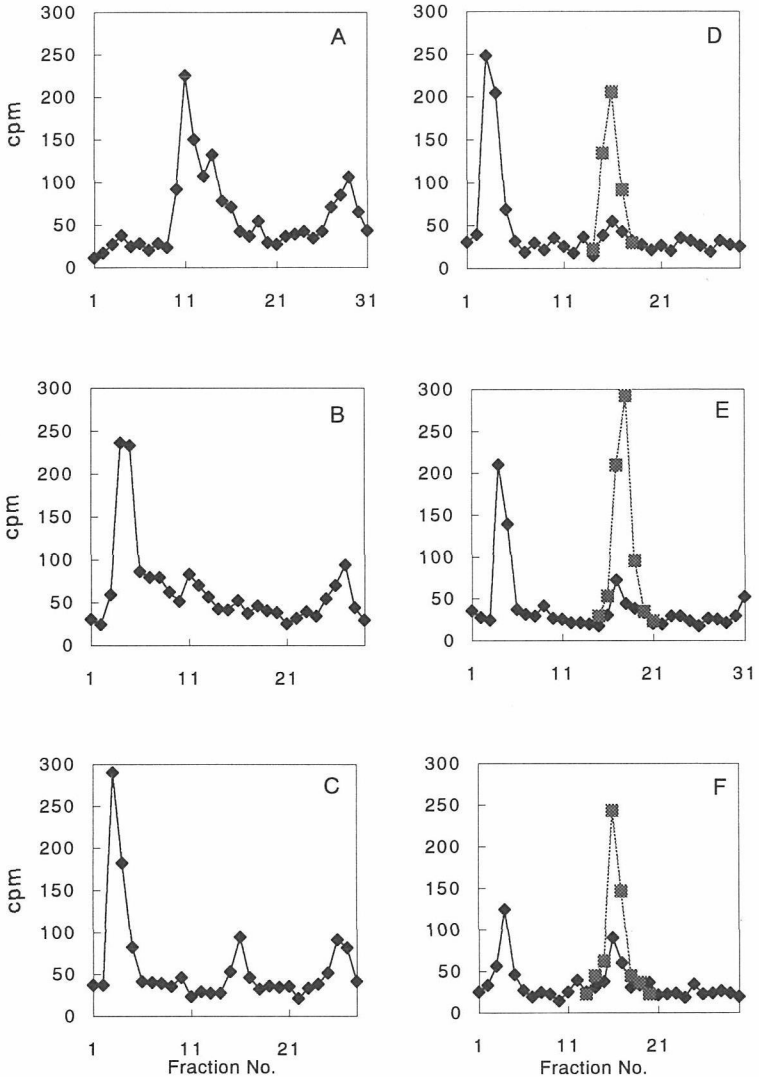


図5 T3w ファージの親 DNA の DNase I 感受性

^3H -チミジンで標識された DNA を持つ T3w ファージを大腸菌に感染後 2 分(A), 8 分(B), 20 分(C)にバクテリアを溶菌し, それぞれの溶菌液を DNase I で処理したものを 2 分(D), 8 分(E), 20 分(F)に示す。

(—◆—) ^3H のカウント, (---■---) ^{32}P のファージ・マーカースのカウントを示す。

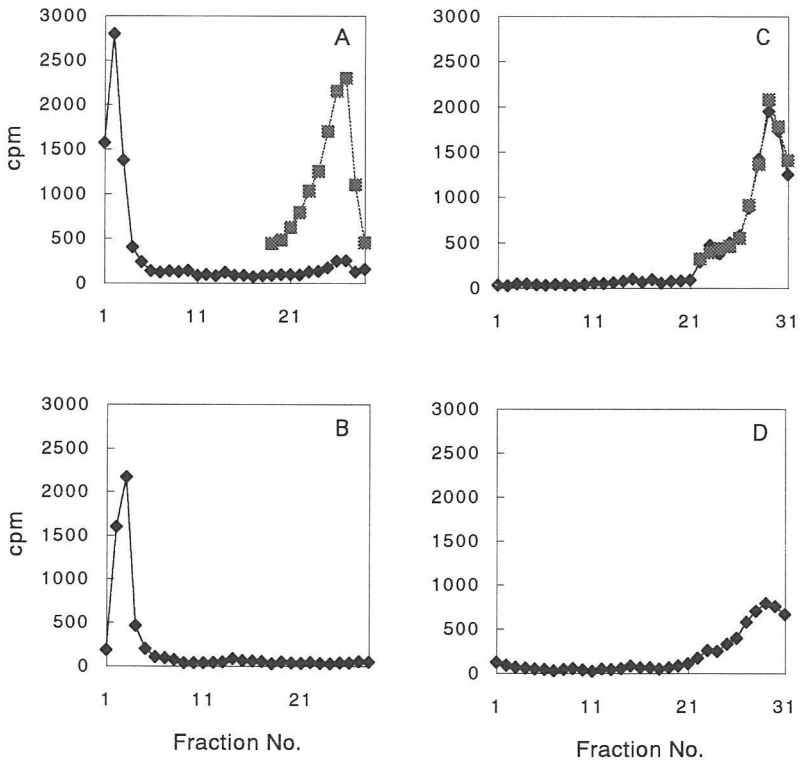


図6 膜に結合した親 DNA の構造

^3H -DNA を持つ T3w ファージを 30°C で感染して 5 分後に集菌した後、リゾチーム、ブリッジ58で溶菌して図4と同じ方法で調べた(A)。この溶菌液を DNase I で処理したものが(B)である。(A)の分画 1 ~ 3 を SDS、プロナーゼ処理して後 5 - 20% 蔗糖密度勾配遠心法で分画したものが(C)であり、(B)の分画 1 ~ 3 を同じようにして分画したものが(D)である。☒は ^{32}P -T3 ファージ DNA のマーカーである。

DNase I により分解されてなくなっているが、膜分画の DNA は DNase I によって分解されないことがわかる。しかし感染後 8 分、20 分では膜 DNA が徐々に DNase I によって分解されるようになってきている。感染後 20 分では、ファージ分画にピークが現れているので親 DNA が娘 DNA に取り込まれていることを示唆している (図 5 F)。DNase I に感受性の分画 No. 25 ~ 30 のピークは膜に結合していないフリーの T3 ファージ DNA であることは図 6 A, C に示されている。宿主の中に注入されたファージ DNA は膜に結

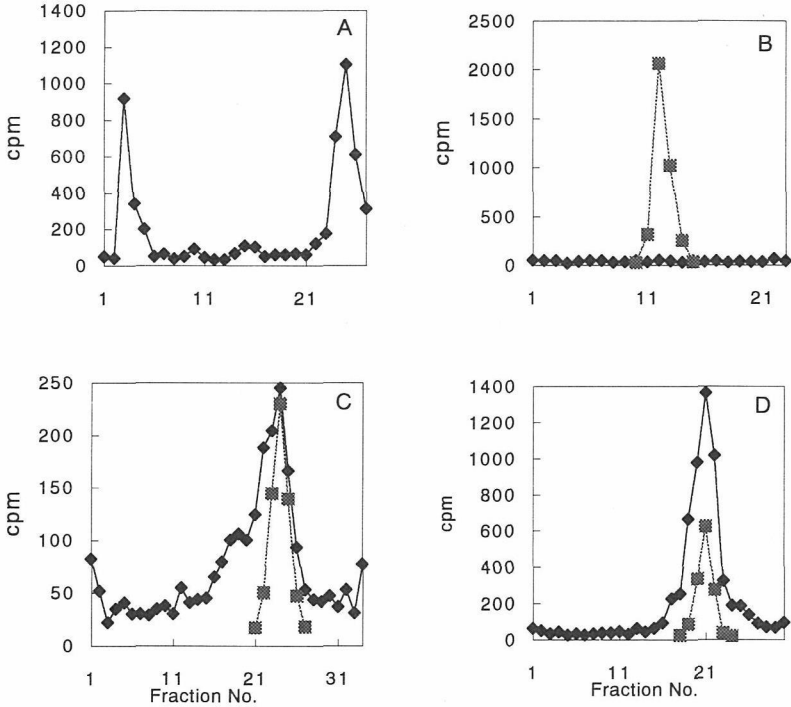


図7 膜に結合した娘DNAの構造

紫外線照射した *E. coli* B₃₋₁ に25℃で T3w フェージを感染し、感染後26分に ³H-チミジンを入れ28分に集菌して溶菌し、図4と同じように実験した(A)。(A)の溶菌液を DNase I で処理して同様に分画したものが(B)である。(A)の分画3および25を SDS, プロナーゼ処理して図6 C, Dと同じように分画したものが各々(C)と(D)である。■は(B)ではマーカーの ³²P-T3 フェージであり、(C)と(D)ではマーカーの ³²P-T3 フェージ DNA である。

合するものとフリーのものが存在し、感染初期では膜結合 DNA は DNase I に抵抗性になり、フリーの DNA は感受性である。

この膜に結合した親 DNA はフェージ頭部にある DNA と長さや構造が同じなのかどうかを調べるために SDS で処理することにより膜から DNA を離してから蔗糖密度勾配遠心法で調べた (図6 A, C)。膜に結合している DNA はフェージ DNA と構造的には同じものであること示している。DNase I に抵抗性の DNA もフェージ DNA と同じ沈降パターンを示しているので同じ構造をしていると思われる (図6 B, D)。

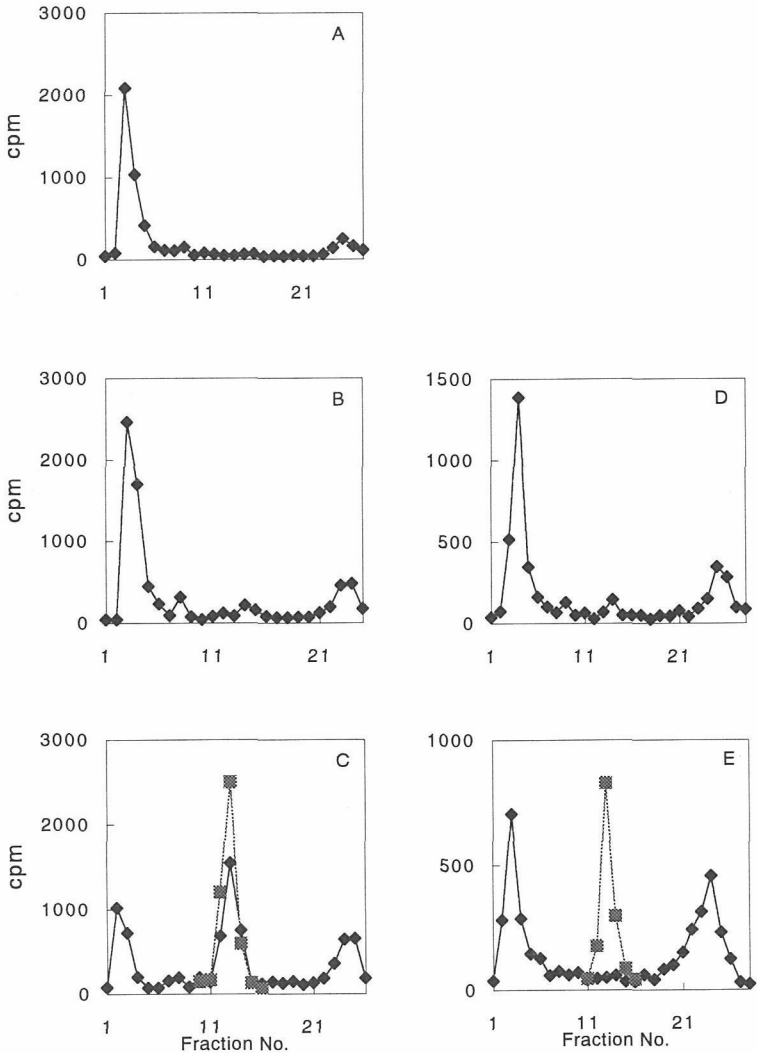


図8 膜に給合した娘DNAの成熟

紫外線照射した *E. coli* B₃₋₁ に T3w ファージを 25℃ で感染後、20分から1分間 ³H-チミジンでパルスラベルし、21分(A)、25分(B)、30分(C)に集菌して、図4と同様にして分画した。T3w ファージの代わりに T3amHM56 (遺伝子9) を感染して、25分(D)、30分(E)も同様に分画した。⊠ はマーカーの ³²P-T3w ファージである。

c) 娘 DNA の膜への結合

親 DNA を複製して得られた娘 DNA は親 DNA と同じように膜に結合するのであろうか。紫外線処理をして宿主の DNA 合成を止めた大腸菌 B₃₋₁ に 25°C で T3w フェージを感染後、26分から28分に ³H-チミジンでパルスラベルして、28分にバクテリアを集めて洗浄後溶菌した。溶菌液を親 DNA の実験と同じようにして蔗糖密度勾配遠心法で分画したものが図 7 A である。娘 DNA の場合も親 DNA と同じく膜に結合した分画 (1~5) とフリーの分画 (23~27) の二つの状態で存在することが示された。図 7 B はこの溶菌液を DNase I で処理してから遠心した結果を表している。親 DNA と異なり娘 DNA は DNase I によって完全に分解されてしまうことがわかる。

膜結合 DNA のピーク (分画 No. 3) とフリー DNA のピーク (分画 No. 25) を取り出して、別々に蔗糖を透析で除いてから、SDS, プロナーゼで DNA に結合している膜やたんぱく質を除いて後、5-20%蔗糖密度勾配遠心法で DNA を分画した。膜分画の結果は図 7 C に示されているように、娘 DNA はフェージの頭部に入っている粒子 DNA に比べてより長くなっている DNA (コンカテマー) が含まれていることがわかる。これに反してフリー分画の DNA は粒子 DNA と同じサイズのものである (図 7 C, D)。

次に合成された娘 DNA の成熟過程を見るために、紫外線照射した大腸菌 B₃₋₁ に 25°C で T3w フェージを感染後、20分から21分に ³H-チミジンでパルスラベルし、21分、25分、38分に感染菌を集めて溶菌した。図 8 A, B, C に示されているように、合成直後の DNA は膜分画に存在し、時間が経つと膜 DNA が減少して、その分フェージ分画に取り込まれていっている。膜 DNA とフェージ粒子 DNA は前駆体—最終産物の関係があることを示している。この結果は T3w フェージの代わりに T3 の遺伝子 9 の突然変異体である T3amHM56 フェージを感染して、同じように分析した実験により確かめられる。amHM56 は頭部構造ができないので、膜 DNA はフリー DNA 分画に移行するだけで、フェージ分画には移行できないことを図 8 D, E に示されている。

考 察

(1) gp13, gp14, gp15, gp16 で構成される構造

遺伝子 13, 14, 15, 16 の欠損粒子は各々遺伝子に対応するたんぱく質を欠

損しているが、外見上は正常フェージと変わらない (図 1)。しかしこれらの粒子は増殖できないので、これらのたんぱく質がフェージの感染過程に必要なことがわかる。Serwer (1979) は T3 フェージと近縁の T7 フェージにおいて、プロヘッドあるいは DNA が抜けた後の空の頭には核構造 (core) が見られ、それらは gp13, gp14, gp15, gp16 を含んでいることを示唆した。また同じく T7 フェージにおいて Roeder and Sadowski (1977) は gp8, gp14, gp15, gp16 が core の形成に関係していることをプロヘッドの電子顕微鏡の観察により示唆した。gp8 は頭部と尾部を結合するところに存在するコネクターたんぱく質であるので core 構造はコネクターに結合していることが示唆されている。T3 フェージにおいても T7 と同様に、遺伝子 15 と 16 の突然変異体のプロヘッド (15⁻プロヘッド, 16⁻プロヘッド) には core がないことが観察された (未発表データ)。また 15⁻プロヘッドは gp8, gp15, gp16 を欠損していることが示されている (図 2 b)。T3 フェージにおいても gp13, gp14, gp15, gp16 で core が形成され、コネクターに結合していることが示唆される。

(2) gp13, gp14, gp15, gp16 の機能

φx174 フェージの H たんぱく質や S13 フェージの遺伝子 3 たんぱく質は多くの機能を持っている。例えば、細胞レセプターへのフェージの結合、親 DNA の RF 形への変換、RF DNA の合成などである。これらのたんぱく質はフェージ増殖の先導的な役割をしているので“パイロットたんぱく質”と呼ばれている。T3 フェージの gp13~16 たんぱく質も多くの機能を持ち、フェージ増殖を導いているように思われる。

表 1 に示しているように、dp の吸着はフェージに比べてかなり悪いが、尾部を欠損して吸着できない dp12 に比べると少し吸着していることがわかる。dp13 と dp14 は T3w フェージに比べてそれぞれ約 30% と 40% の吸着であるが、dp15 と dp16 は約 10% と 20% で、これはかなり悪い。dp15 と dp16 は gp15 と gp16 の両方を失っており、これらのたんぱく質が特に吸着にかかわっていることを示している。Garcia and mlineux (1996) は、T7 フェージの DNA の注入が 2 段階で行われることを報告している。すなわち、宿主に吸着した T7 フェージはまず DNA の左端から数百塩基対を宿主に注入し、その部分の *E. coli* の RNA ポリメラーゼによる転写の後に、残りの

DNA が注入されることを報告している。すなわち、この転写が残りの DNA の注入に必要であるのだが、この転写が起こらなくても gp16 に突然変異が起こると DNA が注入されることを示した。

T3 ファージの場合も T7 ファージと同じように 2 段階の DNA 注入が行われるとすると、次のような仮説が考えられる。dp13~dp16 が DNA を注入できるということは、dp13~dp16 の欠損により 2 段階の DNA 注入が起こらず、dp では 1 段階の DNA 注入を行っている可能性が考えられる。dp は宿主への吸着は悪いながら吸着しているにも関わらず、host killing やファージのたんぱく合成、DNA 合成が全く行われぬ。また親 DNA のバクテリア膜への結合を見る実験から、dp の親 DNA は宿主の膜への結合が阻害されており、膜からフリーの状態でバクテリア内に存在していることがわかった。dp の DNA が膜フリーの状態であることが上記のファージ初期感染過程が阻害されていることの原因であると考えられる。以上のことを総合して考えると、ファージの初期感染過程は、バクテリア膜に吸着したファージが DNA の一部をバクテリア内に注入し、この部分の遺伝子がバクテリアの RNA ポリメラーゼにより読まれ、これらのたんぱく質が DNA の膜への結合、killing、などファージ初期感染過程を担っているものと考えられる。実際 Center (1973) は、T7 の遺伝子 1 の突然変異株感染菌でも親 DNA の膜への結合は起こることを報告している。このように考えると、gp13~gp16 の機能は DNA が 2 段階注入されるために頭の中で DNA を引き留めておく役割をしていることになる。これらのたんぱく質がシリンダー状の形をした core を作り、コネクターに結合していることが示唆されている。このシリンダーに DNA が巻きついていて、これが DNA の注入をコントロールしていると考えられる。

(3) 膜結合 DNA

親 DNA は感染後 2 分には既に膜に結合しており、感染後 20 分でも親 DNA の大部分は膜に結合した状態である (図 5 A~C)。しかし、膜結合親 DNA は感染後 2 分と 20 分では存在の仕方が異なっていることが DNase I の処理により明らかになった。感染後 8 分ごろから DNase I に感受性になることが示されたが、ちょうど 10 分ごろから DNA 合成が始まることと関係があるように思える (図 5 D~F)。膜結合 DNA がなぜ DNase I に抵抗性

があるのかわからないが、可能性として次の二つが考えられる。1) DNA が膜の袋のような構造に入っている；*Haemophilus influenzae* にプラスミッド DNA を転移する実験において、プラスミッド DNA がバクテリアの膜に存在する袋 (transformasome) に入ることが仮定されている (Barany *et al.*, 1983)。2) たんぱく質に包まれて凝縮した状態になっている。3) パイロットたんぱく質や、他のたんぱく質がバクテリアの DNase を阻害している。いずれにしても、この状態では DNA 合成を開始できないと考えられる。感染後 2 分には host killing が始まっているので、バクテリアの中に入った親 DNA は DNase I に抵抗性の状態を確保してからファージ増殖の準備にかかるものと思われる。

親 DNA とは異なって合成された娘 DNA は、膜結合 DNA もフリーの DNA も DNase I に感受性である。そして、膜結合 DNA がファージ粒子 DNA よりも長いコンカテマーになっていて、膜にフリーの DNA がファージ粒子サイズになっていることは興味深いことである (図 7)。T3 ファージの DNA 成熟の研究から、合成直後の DNA は粒子サイズの DNA が長く鎖状に連なったコンカテマーになっていて、その後粒子サイズに切られることが示されている (加藤, 1983)。図 8 に示されているように、T3w ファージでは膜 DNA がファージ粒子の頭の中に包まれていっているのに反して、頭部構造ができない遺伝子 9 突然変異株感染菌では、フリー DNA が蓄積して見られる。この結果は膜結合 DNA が直接頭部に包み込まれていることを示唆している。

参考文献

- Barany, F., Kahn, M. E., and Smith, H. O. (1983). Directional transport and integration of donor DNA in *Haemophilus influenzae* transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7274-7278.
- Center, M. S. (1973). Bacteriophage T7 DNA synthesis in isolated DNA-membrane complexes. *J. Virol.* **12**, 847-854.
- Garcia, L. R., and Molineux, I. J. (1996). Transcription-independent DNA translocation of bacteriophage T7 DNA into *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 6921-6929.
- Granboulan, P., Sechaud, J., and Kellenberger, E. (1971). On the fragility of phage T4-related particles. *Virology* **46**, 407-425.

- Hiebsch, R., and Center, M. S. (1977). Intracellular organization of bacteriophage T7 DNA: analysis of parental bacteriophage T7 DNA-membrane and DNA-protein complexes. *J. Virol.* **22**, 540-547.
- 加藤尚子 (1983). バクテリオファージ T3 の DNA 成熟, 大谷学報 **62**, 1-11.
- Konrnberg, A. (1974). DNA synthesis. p. 240-241. W. H. Freeman & Co., San Francisco.
- Labadan, B., and Legault-Demare, J. (1974). Evidence for heterogeneity in populations of T5 bacteriophage. *J. Virol.* **13**, 1093-1100.
- Pacumbaba, R., and Center, M. S. (1975). Partial purification and properties of a bacteriophage T7 inhibition of the host exonuclease V activity. *J. Virol.* **16**, 1200-1207.
- Roeder G. S., and Sadowski, P. D. (1977). Bacteriophage T7 morphogenesis; phage-related particles in cells infected with wild-type and mutant T7 phage. *Virology* **76**, 263-285.
- Serwer, P. (1976). Internal proteins of bacteriophage T7. *J. Mol. Biol.* **107**, 271-291.
- Serwer, P. (1979). Fibrous projection from the core of a bacteriophage T7 procapsid. *J. Supramol. Struct.* **11**, 321-326.
- Silverstein, J. L., and Goldberg, E. B. (1976a). T4 DNA injection. I. Growth cycle of a gene 2 mutant. *Virology* **72**, 195-211.
- Silverstein, J. L., and Goldberg, E. B. (1976b). T4 DNA injection. II. Protection of entering DNA from host exonuclease V. *Virology* **72**, 212-223.
- Wong, K., and Paranchych, W. (1976). The effect of ribonuclease on the penetration of R17 phage A-protein and RNA. *Can. J. Microbiol.* **22**, 826-831.

(本学教授 分子生物学)