

T3 ファージの尾部繊維の構造

加 藤 尚 子

はじめに

T3 ファージは大腸菌を宿主とする細菌ウィルス（ファージ）の一つである。その構造は正二十面体様の頭部の中に一本の線状二重鎖DNAをもち、宿主吸着器官である尾部と6本の尾部繊維から構成されている（図1）。尾部繊維は長さ約36nmで真中で折れ曲った繊維構造をしていて、遺伝子17でコードされるタンパク（gp 17）一種類で構成されている^①。宿主の細胞表面の特異的な部位（receptor）に吸着して、尾部からDNAを宿主内に注入することによりファージの増殖が始まる。尾部繊維は最初のステップである宿主への特異的な吸着に働いている。従って尾部繊維に欠損をもつ突然変異体は致死的になる。尾部繊維の一端はファージの尾部に結合しており、もう一つの端は細菌に吸着するというように二つの端が異なる働きをしている。又大量のファージをウサギの血液中に注射するとファージに対する抗体（抗ファージ抗体）ができるが、この抗体が反応する部位がファージの尾部繊維であることが知られている^②。T3 ファージの場合も抗血清阻止能（Serum Blocking Power, SBP）は大部分が尾部繊維にあることがわかった^①。このように尾部繊

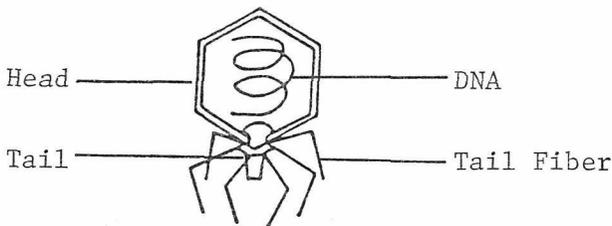


図1 T3 ファージ

頭部の内部は透視図のようにして表わしている。

2 (加藤)

維は一種類のタンパク (gp 17) ながら尾部への結合部位, 抗血清反応部位, 宿主吸着部位など特異的な働きをする部位 (domain) をもつ多機能な構造タンパクである。その意味で尾部繊維の構造と機能の関係を調べることは興味深いことである。過去数年間に行った尾部繊維に関する研究結果をすでに何報か報告しているが, ここではそれらをまとめて特に尾部繊維の構造について報告することにする。

尾部繊維の構造について

1) 尾部繊維の精製^③

尾部繊維の構造と機能との関係を明らかにするためには, まず尾部繊維が何個の単量体 (monomer) からできているのかを知らねばならない。従来精製したフェージのタンパク組成の分析から1フェージ当りの gp 17 のコピー数が計算されて, この結果から1尾部繊維当たり4の gp 17 即ち4量体と見つめられていた。そこで, そのことを確定するために2価のタンパク質架橋剤を用いて分析することが必要になった。そのためには尾部繊維を精製することから始めなければならない。

大腸菌 *E. coli* BB を 5×10^8 cells/ml になるまで M9 A 培養液 (20l) 中で 37°C で培養する。それに 5^-10^- フェージ (遺伝子5と10のアンバー突然変異株) を1細菌当たり5フェージが感染するようにフェージを感染させて 30°C , 25分間培養する。遺伝子5はDNA合成に関する遺伝子であり, 10は頭部構成タンパクであるのでこの感染菌内では, フェージのDNAや頭部が形成されず, また頭部に集合する形で形成される尾部の集合もおこらないで結局フェージ構造体としては尾部繊維が形成されるだけである。感染菌を遠心

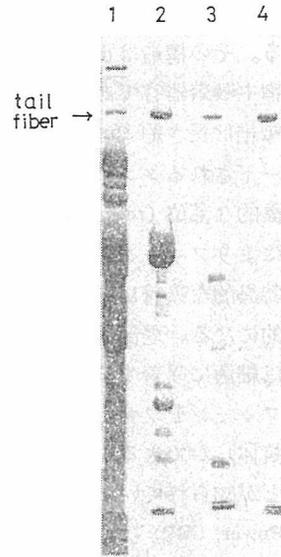


図2 尾部繊維の精製

尾部繊維の精製の各段階をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分析した。1; 1回目のDEAEカラムクロマトグラフィー, 0.15 M-NaCl 溶出分画, 2; フォスフォセルロースカラムの通過分画, 3; セフアデックスG-100カラムの通過分画, 4; ハイドロキシルアパタイト・カラムクロマトグラフィー, 20mM-リン酸バッファー溶出分画

で集めて超音波で細菌をこわして後、リゾチームとトリトンX-100で細胞膜から尾部繊維を遊離する。細胞膜を遠心で除いた上澄液に30%飽和になるよう硫酸アンモニウムを入れ溶かしてできた沈でんを除く。上澄液にさらに60%飽和になるよう硫酸アンモニウムを入れて沈でんした分画を透折後、DEAEカラムクロマトグラフィーにかけて0.15M, NaClで溶出する(図2, 1)。透折後フォスフォ・セルロース・カラムクロマトグラフィーを通過させ(図2, 2), 2回目のDEAEカラム・クロマトグラフィーにかけて0.15M-NaClで溶出する。その溶出液を0.2M-NaClにしてセファデックスG-100カラム・クロマトグラフィーにかけてその通過部分を集めて(図2, 3), 最後にハイドロキシル・アパタイト・カラムクロマトグラフィーにかける。20mMリン酸カリウムを含むバッファーPで溶出すると約80%ぐらいの純度の尾部繊維が得られた(図2, 4)。

2) 精製した尾部繊維のサブユニット構造

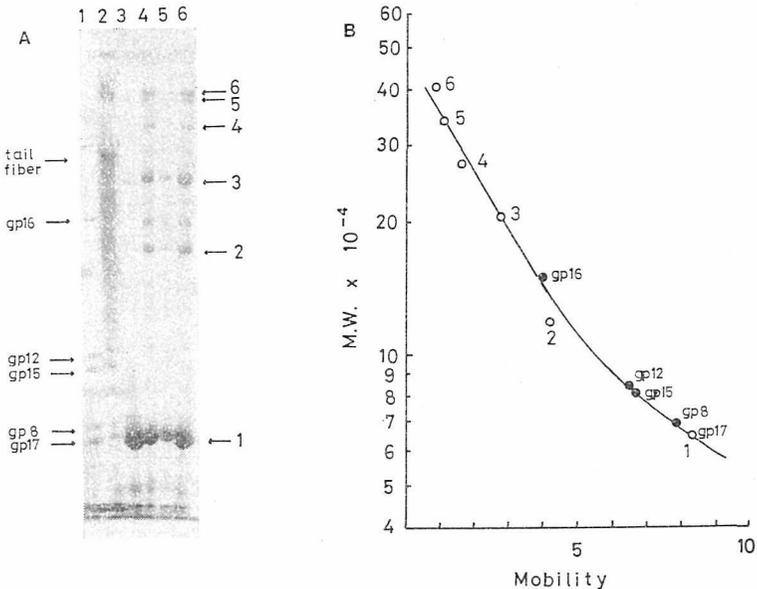


図3 ジメチルスルバイミデートで架橋された gp 17 の SDS-PAGE による分析

A ; 精製された (図 2, 4) は DMS で架橋され, サンプルバッファー中で 100°C, 2 分間加熱した場合としない場合を SDS-PAGE で分析された。1 ; T 3 フェージ (マーカー, 加熱) 2 ; 加熱しない尾部繊維, 3 ; 加熱した尾部繊維, 4~6 ; DMS で架橋後加熱した尾部繊維。

B ; 図 3 A の結果を横軸に移動度, 縦軸に分子量をとってプロットした。

4 (加藤)

精製した尾部繊維を架橋剤スベルイミデート (DMS) を用いて架橋すると、もし3本のサブユニットで構成されているものならば架橋後、熱変性すると三本架橋されているもの (三量体)、二本架橋されているもの (二量体)、一本のもの (単量体) が現われることが期待される。図3に示すように架橋後変性すると、一、二、三、四、五、六量体が現われる。特に一、二、三量体が多く現われ、四、五、六量体は少ししか現われていないことから尾部繊維は gp 17 の三量体であると結論することができた。四、五、六量体は二本の尾部繊維が結合してできたものと考えられる。

T 4 フェージの短尾部繊維 (short tail fiber) は gp 12 (分子量 55,000) のみで構成されている^⑤。短尾部繊維の分子量を Bio-gel P-200 クロマトグラフィーの結果から測定すると167,000となり、gp 12 の三量体であることが報告されている^⑥。T 4 フェージはT 3 フェージより複雑な構造をしていて尾部繊維も長短の二種を各々6本ずつ持っている。長尾部繊維 (long tail fiber) は、吸着作用が可逆的で短尾部繊維が宿主の細胞表面に吸着して始めて不可逆的な吸着が成立することがわかっている^⑦。短尾部繊維はT 3 フェージの尾部繊維と大きさもだいたい同じで電子顕微鏡による観察では、非常によく似た構造をしているので、T 3 フェージの尾部繊維はT 4 フェージの短尾部繊維と同等のものと考えられる。

3) 尾部繊維のサブユニットの方向性^⑧

T 3 フェージ粒子をタンパク分解酵素であるキモトリプシンで消化すると、尾部繊維のみが消化され分子量 65,000 の gp 17 が3本とも全て分子量58,000に切断される (図4)。この分子量58,000の切断片がフェージに結合した形で残っているのかどうかを調べるためにキモトリプシン消化したフェージを CsCl 密度勾配遠心法で精製し、アクリルアミド電気泳動法によってタンパク組成を調べた。図4に示すように58,000断片は、フェージ粒子



図4 キモトリプシン消化したT 3 フェージ

T 3 フェージをキモトリプシン消化後 CsCl 段階的密度勾配遠心法でフェージを精製し、SDS-PAGEで分析した。-; 未消化フェージ (対照), +; キモトリプシン消化T 3 フェージ, 数字は分子量を示す (単位, キロダルトン)。

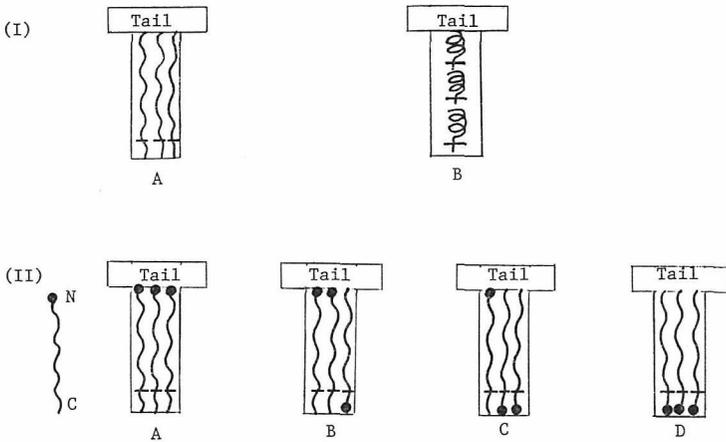


図5 尾部繊維の構造モデル

尾部に結合している1本の尾部繊維を表す。N及びcは gp 17 のN-端及びc-端を表す。gp 17 の横に入れた線はキモトリプシン切断点を表す。

に結合した形で残っていることがわかった。キモトリプシン消化フェージには分子量 65,000 の gp 17 がみられず 58,000 断片の含量は未処理フェージの gp 17 とほぼ同じくらいであった。この結果から尾部繊維の3本の gp 17 は互いに平行して並んでいる図5, I Aのモデルが適していると考えられる。即ち, もし図5, I Bのモデルならばキモトリプシン消化により58,000断片の含量は分子量65,000のものの $\frac{1}{2}$ 量に減るか,あるいは,切断されない65,000のものが残るはずである。実際キモトリプシン消化したフェージの尾部繊維を尾部に結合した形で電子顕微鏡観察すると $\frac{1}{2}$ 程長さが短くなっているのが観察された(未発表データ)。

次に3本の gp 17 が平行して縦列に配置しているとする3本の gp 17 の方向性はどうか。図5, IIに示すモデルが考えられる。これを決定するためには, キモトリプシンの切断点が gp 17 のN-端側か, それともC-端側にあるかを決定すれば良い。即ちキモトリプシンで切断された gp 17 のN-端のアミノ酸配列を分析して, N-端が保存されておれば図5 II, Aのモデルになるし, N-端アミノ酸が正常な gp 17 と完全に異っておれば図5 II, Dのモデルになり, 2種以上のアミノ酸になればB, Cのモデルが考えられる。キモトリプシン消化された尾部繊維のN-端のアミノ酸分析がなされた。この結果両方ともN-端は, N-Ala-X-Val-Ile- (Xは同定で

1-25	Ala	Asn	Val	Ile	Lys	Thr	Val	Leu	Thr	Tyr	Gln	Leu	Asp	Gly	Ser	Asn	Arg	Asp	Phe	Asn	Ile	Pro	Phe	Glu	Tyr
26-50	Leu	Ala	Arg	Lys	Phe	Val	Val	Val	Thr	Leu	Ile	Gly	Val	Asp	Arg	Lys	Val	Leu	Ser	Ile	Asn	Ala	Asp	Tyr	Arg
51-75	Phe	Ala	Thr	Arg	Thr	Thr	Ile	Ser	Leu	Thr	Lys	Leu	Thr	Gly	Pro	Ala	Asp	Gly	Thr	Thr	Thr	Ile	Glu	Leu	Arg
76-100	Arg	Val	Thr	Ser	Thr	Thr	Met	His	Val	Ala	Glu	Val	Asp	Gln	Thr	Asp	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr	Asn	Val
101-125	Ala	Gln	Ile	Gln	Thr	Met	His	Val	Ala	Glu	Glu	Ala	Arg	Asp	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ile	Gly	Val	Asn	Asn	Asp
126-150	Gly	His	Leu	Asp	Ala	Arg	Gly	Arg	Arg	Ile	Val	Asn	Leu	Ala	Asn	Ala	Val	Asp	Asp	Arg	Ala	Val	Pro	Phe	
151-175	Gly	Gln	Leu	Lys	Thr	Met	Asn	Gln	Asn	Ser	Trp	Gln	Ala	Arg	Asn	Glu	Ala	Leu	Phe	Arg	Asn	Glu	Ala	Glu	
176-200	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Thr	Glu	Val	Phe	Lys	Asn	Glu	Ser	Gly	Thr	Asn	Ala	Thr	Asn	Thr	Lys	Gln	Trp	Arg	Asp
201-225	Ala	Asn	Gly	Ser	Arg	Asp	Glu	Ala	Glu	Lys	Asn	Thr	Ala	Gly	Gln	Tyr	Ala	Thr	Ser	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Asp
226-250	Ser	Ala	Thr	Ala	Thr	Gln	Ser	Glu	Val	Asn	Ala	Glu	Asn	Ser	Ala	Thr	Asp	Ala	Asp	Asn	Ser	Arg	Asn	Leu	
251-275	Ala	Glu	Gln	His	Ala	Asp	Arg	Leu	Glu	Leu	Gly	Ile	Phe	Asn	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	
276-300	Asp	Lys	Gly	Asp	Gly	Thr	Asn	Val	Tyr	Trp	Lys	Gly	Ile	His	Ala	Asn	Gly	Leu	Tyr	Leu	Thr	Ser	Ser	Asp	
301-325	Gly	Phe	Asp	Cys	Gly	Gln	Tyr	Gln	Phe	Gly	Ser	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ser	Val	Met	Glu	Trp	Gly	Ile	Ile	Ile	
326-350	Glu	Lys	Ala	Trp	Leu	Met	His	Val	Glu	Arg	Glu	Arg	Thr	Thr	Ala	Ile	Val	Asp	Asn	Ile	Gln	Leu	Val	Val	
351-375	Asn	Gly	His	Ile	Ile	Ala	Gln	Gly	Ala	Gln	Gly	Asp	Met	Thr	Gly	Pro	Leu	Lys	Leu	Gln	Asn	Gly	Leu	Leu	
376-400	Glu	Ser	Ala	Ser	Asp	Lys	Ala	Gln	Tyr	Ile	Ser	Lys	Asp	Gly	Asn	Arg	Asn	Trp	His	Ile	Gly	Arg	Gly	Gly	
401-425	Ser	Asp	Asn	Asn	Asn	Asp	Cys	Thr	Phe	His	Ser	Tyr	Val	Tyr	Gly	Thr	Asn	Leu	Leu	Lys	Pro	Asp	Tyr	Ala	
426-450	Val	Val	Asn	Lys	Arg	Phe	His	Val	Gly	Gln	Ala	Val	Val	Ala	Thr	Asp	Gly	Asn	Ile	Gln	Gly	Thr	Lys	Trp	Gly
451-475	Arg	Lys	Trp	Leu	Asp	Ala	Tyr	Leu	Asn	Asp	Thr	Tyr	Val	Lys	Thr	Met	Ala	Trp	Gln	Val	Trp	Ala	Ala	Ala	
476-500	Ala	Ser	Asp	Ser	Met	Gly	Gly	Ser	Gln	Thr	Asp	Thr	Leu	His	Arg	Thr	Cys	Asp	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	
501-525	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	Ile	Gly	Thr	Ser	Ser	Glu	Leu	Val	Leu	Thr	Val	Ser	Thr	Ser	Phe	Gln	Pro	Arg	Arg	
526-550	Trp	Leu	Lys	Phe	Gln	Ile	His	Ser	Asn	Gly	Arg	Val	Phe	Lys	Asn	Ile	Ala	Asp	Arg	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ala
551-556	Ile	Ala	Val	Glu	Asp	Val																			

図6 sp 17 の アミノ酸配列

遺伝子17のDNA塩基配列から決定された sp 17 のアミノ酸配列を示す。点線のアンダーラインはN-端のアミノ酸分析された部分を示す。アンダーラインは高等生物の認識部位に似た配列を示す。四角で囲ったアミノ酸はキモトリプシン切断点と思われるアミノ酸を示す。

表1 尾部繊維のN-端アミノ酸配列

N-端アミノ酸配列	
DNA塩基配列	N-Ala-Asn-Val-Ile-
未処理尾部繊維	N-Ala- X -Val-Ile-
キモトリプシン処理尾部繊維	N-Ala- X -Val-Ile-

きなかった) というように同じアミノ酸配列をしており、この配列は遺伝子17のDNA塩基配列から推定されたgp 17のN-端のアミノ酸配列N-Ala-Asn-Val-Ile-(図6)に相当することがわかった(表1)。この結果はキモトリプシン消化されたファージのgp 17のN-端は完全に保存されていることを示し、図5Ⅱ、Aのモデルが正しいと結論することができた。即ちgp 17は3本ともN-端側で尾部に結合しているということである。

4) gp 17の一次構造

T3ファージの遺伝子17はT3-DNAを制限酵素Hpa Iで消化した時、DNA断片M, J, Iの三つにまたがって存在する。このDNA断片M, J, Iが各々クロニングされ次いで塩基配列が決定された。図6にその塩基配列から決定されるアミノ酸配列を示す。

① キモトリプシン切断点の同定

T3ファージをキモトリプシンで消化すると尾部繊維だけが消化され、変性後SDSポリアクリルアミド電気泳動法で調べると分子量65,000のgp 17が分子量58,000になる。前章で述べたように、このキモトリプシン切断点はN-端が保存されていることから、C-端から分子量7000ぐらい入った所であろうと考えることができる。キモトリプシンの消化点はチロシン、フェニールアラニンのC-端側を切るとされているので、丁度56,000ぐらいの分子量の断片が得られる切断点をアミノ酸配列上に推定することができる。SDSポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)の解析では分子量65,000とされていたが、アミノ酸配列から計算すると61,800になった。そこでキモトリプシン消化されたgp 17の分子量はSDS-PAGEの位置からは5,800となるが正常gp 17の分子量(65,000)を61,800と補正すると、58,000は55,200になる(表2)。約55,200の断片を生じるような切断点をC-端でさすと480番目と499番目のチロシンと521番目のフェニールアラニンが上げられる。これらの箇所切断されたとして各々断片の分子量を計算すると53,380, 55,400, 57,680になり55,200に一番近い値は499番目のチロシンとなる。

表2 キモトリプシン切断点の同定

切断箇所	計算値(分子量)	
480 Tyr	53.38 kd	
499 Tyr	55.4 kd	
521 Phe	57.68 kd	

	観測値(分子量)	計算値(分子量)
gp 17	65.0 kd	61.80 kd
切断 gp 17	58.0 kd	55.20 kd (61.80 X 58.0 / 65.0)

⑥ 宿主認識部位

血小板が凝集したり細胞性粘菌が集合するといった現象は細胞どうしが細胞表面にある特異的な部位 (receptor) を認識することによって行われている。receptor を認識することができる物質, 例えば血小板だとフィブロネクチンや細胞性粘菌だとジスコイジン I などは細胞が凝集を開始するためのひきがねによって細胞表面に分泌される。そして細胞表面の receptor にフィブロネクチンやジスコイジン I が結合することにより特異的な細胞どうしの凝集 (粘着) が起こると考えられている。このフィブロネクチンやジスコイジン I が細胞の receptor に結合する部位には2つのタンパクに共通のアミノ酸配列 (Gly-Arg-Gly-Asp-) があり, このペプチドが結合に関係していることが報告されている^{⑪⑫}。

ファージが宿主に吸着する場合, 尾部繊維が宿主の表面に特異的に吸着する。T 4 ファージの吸着には宿主の LPS (リボポリサッカライド) と細胞表面のタンパクである OmpC (分子量36,000) が関係していることが報告されている^⑬。T 3 ファージの場合も LPS と細胞表面タンパクが尾部繊維と作用してファージの吸着を成立させているものと考えられる。尾部繊維 (gp 17) が細胞表面の LPS や表面タンパクに特異的に結合することは, 血小板上のグリコプロテイン III に特異的に結合するフリプロネクチンや細胞性粘菌の集合において細胞表面で細胞表面タンパクのグリコプロテインや N-アセチルグルコサミンに結合するジスコイジン I との類似性が考えられる。フィブロネクチンやジスコイジン I には細胞 receptor に結合する部位 (domain) があり Gly-Arg-Gly-Asp- の共通のアミノ酸配列をもっていることが報告されている。T 3 の尾部繊維である gp 17 についてアミノ酸配列を調べてみると

N-端から399番目に Gly-Arg-Gly-Ser-Asp- の配列がみつかった。398番目から406番目ぐらいまで疎水性が低いアミノ配が並んでおり、このあたりが立体構造的に分子の外側に出ているとすると細胞表面との結合に関係することも考えやすい。今のところこの部位が細胞 receptor との結合部位であるという証拠は一つもないが高等な生物との類似性が見つかったことは興味深いことである。

尾部繊維の二次、三次、四次構造のくわしい解析がもっか進行中で、それらが解明されると機能と構造の関係が明確になるとと思われる。

ま と め

T 3 の尾部繊維の構造は gp 17 (遺伝子17でコードされるタンパク、分子量61,800) が3本平行して並び尾部繊維をつくっている。それらのN-端側が尾部に結合し、C-端側が宿主への吸着に関与している。gp 17 のアミノ酸配列がDNA塩基配列から決定され、高等生物の細胞吸着部位 (receptor) に結合するタンパクに共通なアミノ酸配列によく似た配列 (-Gly-Arg-Gly-Ser-Asp-) が gp 17 にもあることがわかった。

引 用 文 献

- ① Matsuo-Kato, H., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1981) Structure and assembly of bacteriophage T 3 tails. *Virology* 109, 157-164.
- ② De Mars, R. I. (1955). The production of phage-related materials when bacteriophage development is interrupted by proflavine. *Virology* 1, 83-99.
- ③ Kato, H., Fujisawa, H., and Minagawa, T. (1985). Purification and Characterization of gene 17 product of Bacteriophage T 3. *Virology* 146, 22-26.
- ④ Davies, G. E., and Stark, G. R. (1970). Use of dimethyl suberimidate, a Cross-Linking Reagent, in Studying the Subunit Structure of Oligomeric Proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 66, 651-656.
- ⑤ Kells, S. S., and Haselkorn, R. (1974). Bacteriophage T 4 short tail fibers are the product of gene 12. *J. Mol. Biol.* 83, 473-485.
- ⑥ Kells, S. S., Ohtsuki, M., and Haselkorn, R. (1975). The Structure of bacteriophage T 4 gene 12 protein. *J. Mol. Biol.* 99, 349-351.
- ⑦ Goldberg, E. (1983). Recognition, Attachment, and Injection. *Bacteriophage T 4*, American Society for Microbiology, Washington, D. C. 32-39.
- ⑧ Kato, H., Fujisawa, H., and Minagawa, T. Subunit arrangement of the

tail fiber of bacteriophage T 3. Virology in press.

- ⑨ Yamada, N., Fujisawa, H., Kato, H., Hamada, K., and Minagawa, T. (1986). Cloning and Sequencing of the Genetic Right end of bacteriophage T 3 DNA. Virology in press.
- ⑩ Laskowski, M. (1955). Chymotrypsinogens and Chymotrypsins. Methods in Enzymology 2, 8-26.
- ⑪ Gardner, J. M. and Hynes, R. O. (1985). Interaction of fibronectin with its Receptor on Platelets. Cell, 42, 439-448.
- ⑫ Gabius, H. J., Springer, W. R., and Barondes, S. H. (1985). Receptor for the cell binding site of Discoidin I. Cell, 42, 449-456.
- ⑬ Yu, F., and Mizushima, S. (1982). Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T 4. J. Bacteriol. 151, 718-722.

(本学助教授 自然科学)