

バクテリファージ T3 の DNA 成熟

加 藤 尚 子

は じ め に

ファージが宿主に感染すると宿主の高分子合成が押さえられ、代ってファージの増殖に必要な高分子合成が始まる。^① T3 ファージの場合感染後4分くらいからファージのDNA合成に必要なタンパク質が合成され10分頃よりDNA合成が開始する。次いでファージ構造タンパク質（頭部や尾部など）が合成されて、それらが集合して娘ファージ粒子が形成される。感染後30分には宿主細胞が溶けて1細胞当たり200ぐらいの娘ファージが出てくる。^②

T3 ファージ粒子は遺伝情報を荷うDNAをタンパク質で包んだ正20面体構造と、宿主への吸着装置である尾部からなる。頭部形成は、まず頭部タンパク質が集合してDNAのコンテナともいべき頭部前駆体ができ、その中へDNAが包み込まれて完了する。^③ 包み込まれるDNAは感染後合成されるが、蔗糖密度勾配遠心法で分析すると、新しく合成されるファージDNAはファージ粒子の頭部にあるDNA（成熟DNA）より速く沈降することが知られている。その物理的な性質や電子顕微鏡観察から、このDNAは成熟DNAが直線的に長く連なったDNA(concatemer DNA)であることが知られている。このDNAは成熟DNAに変ることから成熟DNAの前駆体と考えられている。前駆体DNAが成熟DNAに変化する過程がDNA成熟の過程であり、このDNA成熟過程はファージ構造形成と関係していることが、種々のファージで知られている。本論文ではT3 ファージの前駆体DNAには沈降速度の差により、DNA-I (fast sedimenting) 及びDNA-II (slowly sedimenting) の2種類のタイプがあること、DNA-IからIIへの変換は遺伝子19タンパク質が、DNA-Iから成熟DNAへの変換には頭部へのDNA包み込み過程が関与していることがアンバー突然変異体を用いた研究から

示唆されたことを報告する。

材料と方法

(a) 宿主とファージ

大腸菌 (*Escherichia coli*) B_{s-1} は紫外線照射に感受性である。T 3 のアンバー突然変異体は、am HM 56 (9), am HM 101 (10), am NG 14 (11), am HM 79 (12), am NG 155 (13), am HM 51 (14), am NG 177 (15), am HM 65 (16), am HM 93 (17), am HM 90 (19) である。() の番号は遺伝子名で、これら全てのアンバー突然変異体はDNA合成があるが粒子形成過程が欠損している。

(b) 培養液

T CG 培養液 : Tris-glucose 培地に 0.4% ビタミンなしのカザミノ酸 (Difco) を含む。

(c) ^{32}P 標識ファージの調整

E. coli B_{s-1} を 37°C , T CG 培養液で通気培養し 2×10^8 細胞/ml になった時 ^{32}P リン酸 ($5\mu\text{c}/\text{ml}$) を加え 5×10^8 細胞/ml の時 1 菌当り 1 の割合で T3 ω を感染した(感染多重度 moi=1)。溶菌後超遠心分離法でファージを精製した。

(d) 庚糖密度勾配法によるDNAの分析

紫外線照射した *E. coli* B_{s-1} にファージを moi=20 で感染した。感染後 15 分に ^3H -チミジン ($5\mu\text{c}/\text{ml}$) を加え 1 分か 2 分後に多量の(各 $100\mu\text{g}/\text{ml}$) チミジンとチミンを加えた。一定時間後培養液をとり出し同量の停止液 (0.1M, NaCN, 0.2M, EDTA, pH 8.0, 数滴のクロロホルム) を加えて反応を停止した。次いでリゾチーム ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え 37°C 5 分間静置し, SDS (0.4%) を加えた。5 分後 ^{32}P 標識ファージをマーカーとして加え 70°C , 15 分間加熱した。さらにプロナーゼ ($1\text{mg}/\text{ml}$) を加えて一晩 30°C に静置した。この溶菌液を 5-20% 庚糖密度勾配 (0.1M, EDTA, 0.05M, NaCl, pH 8.0) の上に乗せ日立の SW40ローターで 30,000 回転/分, 60 分間遠心し, チューブの底から 7 滴ずつ直接ろ紙に分画し, トリクロル酢酸不溶性画分の放射活性を測定した。アルカリ庚糖密度勾配の場合には, サンプルに 0.1M, NaOH を加え 5 分間置いてから 5-20% アルカリ性庚糖密度勾配 (0.1M, NaOH, 0.9M, NaCl, 0.05M, EDTA) を用いて 40,000 回転/分, 15°C で 150 分間遠心し, 上述したのと同様の方法で分画し, 放射活性を測定した。遠心後の放射活性の回収率はいつ

も90%以上だった。

結 果

宿主のDNA合成を止めるためにあらかじめ10秒間紫外線照射した大腸菌 B_{s-1} にT3ファージを感染した。T3のDNA合成は30°Cで感染後10分頃より始るので、感染後15分に³H-チミジンを入れ16分に大量のチミジンとチミンを加えることにより15分から16分の1分間に合成されたDNAを³Hでパルス標識した。パルス直後の16分とチェイスした30分にサンプリングした感染菌溶液をリゾチーム-SDS-プロナーゼ法で溶菌して5-20%蔗糖密度勾配遠心法で分画したものが図1である。16分にみられる³H-DNA即ち合成直後のDNAは成熟DNAより速く沈降しているが、30分にみられるDNAは全て成熟DNAと同じ分画に沈降している。図1Aからわかるように成熟DNAより速く沈降するDNAは2種類あり、1つは成熟DNAより2-3倍速く巾広いピークをつくって沈降するDNA(DNA-Iと名付ける)、他は1.1-1.2倍速く鋭いピークをつくって沈降するDNA(DNA-IIと名付ける)である。DNA-IもIIもチェイスすると成熟DNAになることからDNA

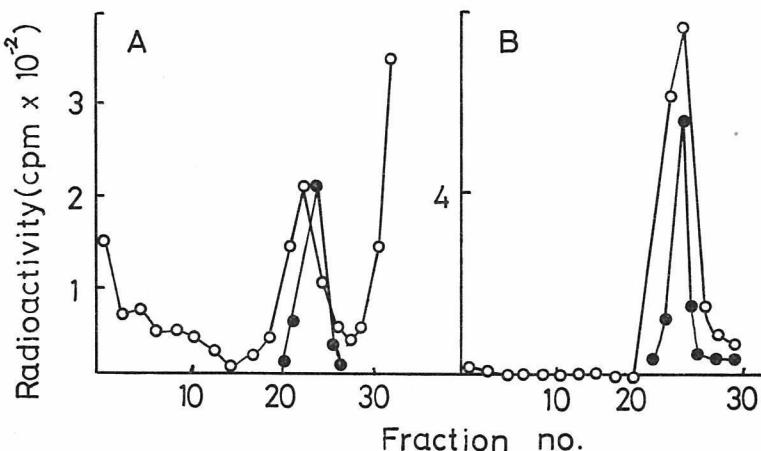


図1 T3 ω 感染菌の沈降パターン

紫外線照射された $E. coli B_{s-1}$ にT3 ω を感染した。感染後15分に³H-チミジンを加え、16分に各100 μ g/mlのチミジンとチミンを加えた。16分(A)と30分(B)にサンプルをとってリゾチーム-SDS-プロナーゼ法で溶菌して蔗糖密度勾配遠心法で分析した。³²P-標識DNAはマーカーである。

—○—³H の放射活性, —●—³²P の放射活性

- I, II は成熟 D N A の前駆体であると考えられる。即ち D N A 成熟は D N A - I, II が成熟 D N A に変化する過程だといえる。

D N A 成熟におけるクロラムフェニコールの効果

T 4 D N A の concatemer の成熟には頭部形成に関するタンパク質が要求されることが報告されている。T 3 D N A 成熟についても又、頭部形成が必要かどうかを検討することは興味深いことである。タンパク質合成の阻害剤であるクロラムフェニコール (C M) を感染後10分以降に加えた場合 D N A 合

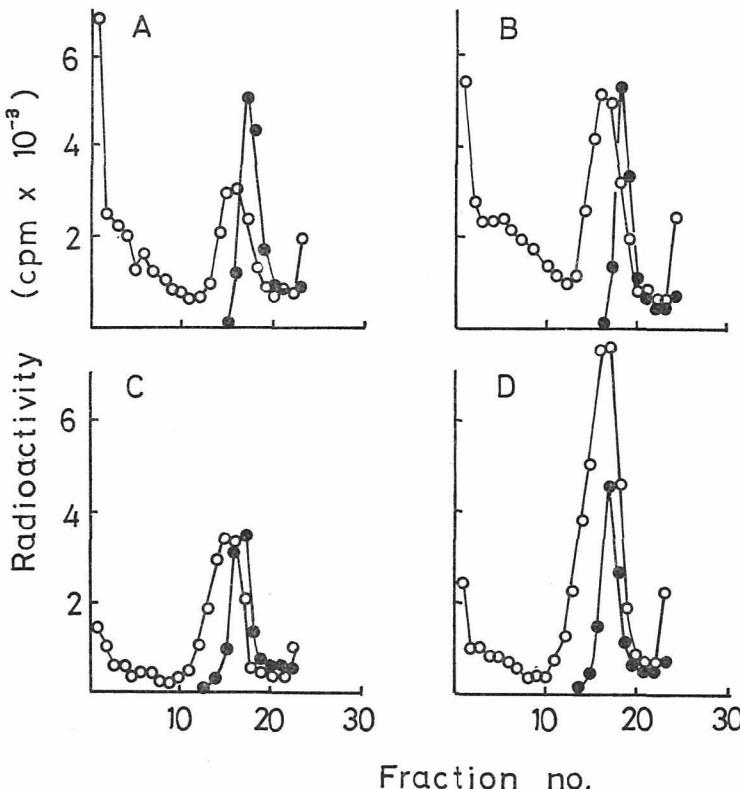


図 2 CMを加えた場合の感染菌D N A の沈降パターン

紫外線照射した B_{8-1} に T3 ω を感染後10分 (A, B) あるいは12分 (C, D) に CM (50 μ g/ml) を加えた。 3 H-チミジンで15分から17分パルス標識し、17分 (A, C) と30分 (B, D) にサンプルをとって図1と同様にして分析した。

—○— 3 H の放射活性, —●— 32 P の放射活性

成には、ほとんど影響しないことがわかっている(未発表データ)。感染後15分から17分に合成された³H-DNAの成熟はCMを10分に加えた場合完全に阻害されているが(図2 A, B) CMを12分に加えた場合には成熟はほとんど正常に進行している(図2 C, D)。これらの結果はDNA成熟の過程に10分以後に合成されるタンパク質が要求されることを示している。

DNA-IとIIのアルカリ庶糖密度勾配遠心法による分析

DNA-IとIIの構造について調べるために中性庶糖密度勾配遠心法でDNA-I, IIを精製し、その後アルカリ庶糖密度勾配遠心法で分析した。

DNA-IはCMを10分に加えた感染菌を³H-チミジンで15分から17分の間ペルス標識し17分と30分に溶菌して中性庶糖密度勾配遠心法で分画することにより得た。図3 Aが示すように17分に調整した変性DNA-Iは変性成熟DNAと同じ速さで沈降している。しかし感染後30分に調整した変性³H-DNA-Iは変性成熟DNAより速く沈降した(図3 B)。以上の結果からDNA-Iは数個の成熟DNAが互いに直線的に連ったconcatemer DNAであると結論した。合成直後はnickを持った状態であるが合成後期ではnickがつながったものと解される。

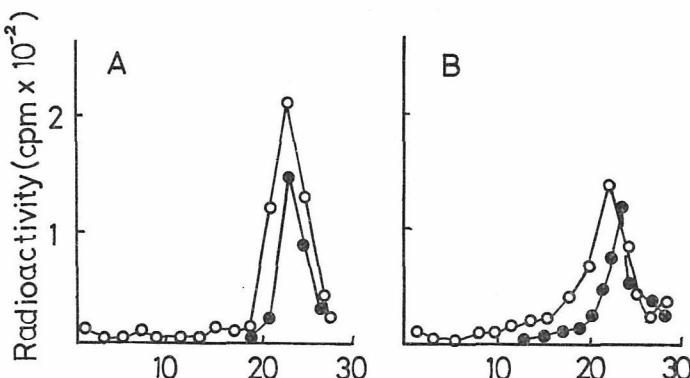


図3 DNA-Iのアルカリ庶糖密度勾配沈降パターン

感染菌にCMを(50μg/ml) 10分に加え³H-チミジンで15分から17分までペルス標識した。17分(A)と30分(B)にサンプルをとってSW25ローター、25,000回転/分、270分間中性庶糖密度勾配遠心をした。DNA-I分画(分画ナンバー10~15)を集め透析後SW40ローターで30,000回転/分、60分間アルカリ庶糖密度勾配遠心を行った。

—○—, ³H—●—³²P(マーカー)

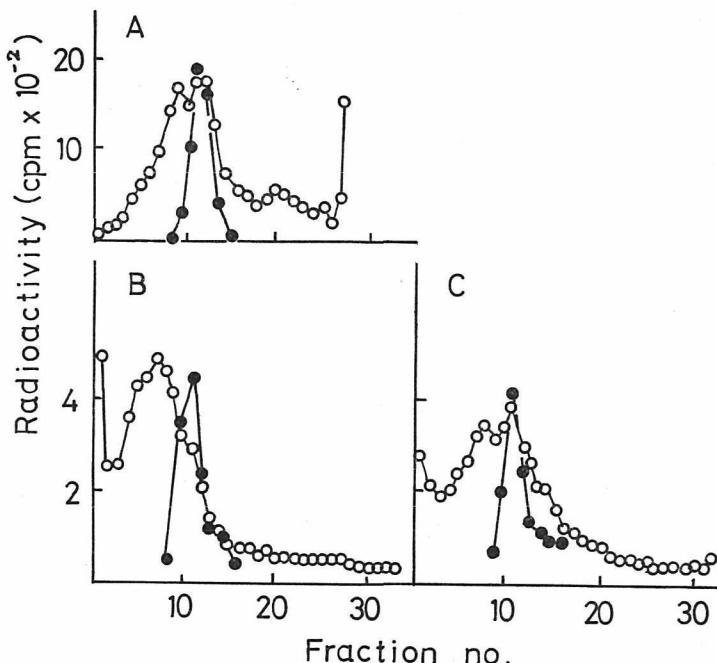


図4 DNA-II のアルカリ庶糖密度勾配沈降パターン

T3 ω 感染菌を感染後15分から16分まで1分間 ^3H -チミジンでパルス標識した。16分に感染菌を溶菌して後 SW25ローターで25,000回転/分、270分間中性庶糖密度勾配遠心で分画した。DNA-II 分画(分画ナンバー10, 図4 A)を透析後、 ^{32}P -成熟DNAを加えてSW40ローターで40,000回転/分、150分間、中性(B)あるいはアルカリ性(C)庶糖密度勾配遠心を行った。

—○— ^3H , —●— ^{32}P (マーク)

^3H -DNA-IIを得るために感染菌を16分に溶菌した。図4 Aの分画10から得た ^3H -DNA-IIを再度中性及びアルカリ性庶糖密度勾配遠心で分画した。中性庶糖密度勾配遠心ではDNA-IIの位置にピークをつくっている(図4 B)。図4 Cが示すように変性 ^3H -DNA-IIは2つのピークをもって沈降した。1つは変性成熟DNAと同じ速さで他は変性成熟DNAより約1.2倍速く沈降した。これらの結果からDNA-IIは成熟DNAが数分子おそらく2~3分子からなっており、片方の鎖だけが共有結合でつながっていて、もう片方はnickをもっているか、あるいはポピュレーションとしてnickをもつものともたないものが存在すると考えられる。

DNA成熟に対するアンバー突然変異の効果

形態形成に欠損のあるアンバー突然変異体を nonpermissive な菌に感染し

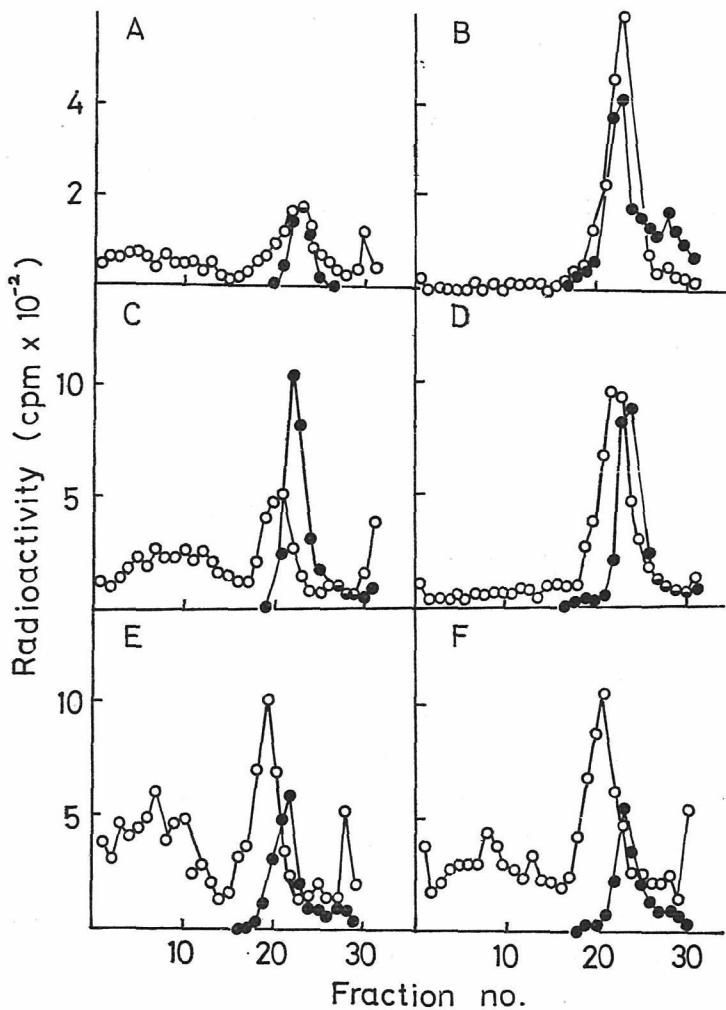


図5 アンバー突然変異体感染菌におけるDNAの沈降パターン

紫外線照射されたに *E. coli* B_{s-1} アンバー突然変異体を感染し、15分から17分まで ^{3}H -チミジンでパルス標識した。サンプルを17分（左側）、30分（右側）にとって図1と同様にした。A, B; am HM 79 (遺伝子12), C, D; am HM 56 (遺伝子9), E, F; am HM 90 (遺伝子19),

—○— ^{3}H , —●— ^{32}P (マーカー)

て15分から17分まで³H-チミジンでパルス標識してDNA成熟を調べた。図5が示すように、全ての突然変異体についてパルス直後のDNAはDNA-IとIIの形成が見られた。しかしDNA成熟の様相は3つのクラスに分けられた。クラス1(遺伝子11, 12, 13, 14, 15, 16, 17)ではDNA成熟は正常におきる。即ち³H-DNA-I, IIはチェイス後に成熟DNAになった。クラス2(遺伝子9と10)では³H-DNA-Iはなくなって³H-DNA-IIがたまっているが成熟DNAは形成されなかった。クラス3(遺伝子19)ではDNA成熟が完全に阻害された。これらの結果はDNA成熟がDNA-II \Rightarrow DNA-I \Rightarrow DNA-II \Rightarrow 成熟DNAと進行するものと考えられる。即ちクラス3はDNA-II \Rightarrow DNA-Iまで進行するがDNA-I \Rightarrow IIへ行く段階で阻害されている。クラス2はDNA-II \Rightarrow DNA-I \Rightarrow DNA-IIまで進行したがDNA-II \Rightarrow 成熟DNAになる最後の段階が阻害されていると解される。

討 論

T3感染菌で合成されるDNAを庶糖密度勾配遠心法で解析すると成熟DNAと異なる速さで沈降する2つのタイプのT3DNA(DNA-Iと-II)が見つかった。アルカリ庶糖密度勾配遠心の結果から合成直後のDNA-Iは成熟DNAと同じ長さのDNAが切れ目をもって長く連ったconcatemer分子であることがわかった。この分子はCMによってDNA-IIへの進行が阻害されるとnickがつながった分子になる(図3)。DNA-IIはアルカリ庶糖密度勾配遠心法で成熟DNAと同じ速さで沈降するピークと成熟DNAより1.2倍速く沈降するピークにわかれた(図4)。このことからDNA-IIは片方のDNA鎖だけnickのある短いconcatemerかあるいはnickのある環状構造が考えられる。しかし電子顕微鏡観察では環状は認められなかった。

アンバー突然変異体感染菌で合成されるファージDNAを解析したところDNA成熟の様相により3つに分類できた。クラス1の突然変異体感染菌ではDNA成熟は正常に進行した。

クラス2のアンバー突然変異体の場合は、パルス直後のDNAはDNA-I, -IIであるが、チェイスするとDNA-IIになり成熟DNAにはならなかつた。

クラス3のアンバー突然変異体感染菌においてはパルス直後のDNAは同

じくDNA-Iと-IIであるがチエイス後も変化せずにDNA-I,-IIの形で残る。クラス3がDNA-I→DNA-IIへの段階に欠損をもっていると考えるとDNA-IIができることが疑問になる。遺伝子6の欠損したアンバー突然変異体感染菌で合成されたDNAはDNA-IIのみでDNA-Iができない。これらの結果を考え合わせるとDNA成熟過程はDNA-II^(A)→DNA-I^(B)→DNA-II^(C)→成熟DNAと進行すると考えられる。反応(A)はDNA合成又は組換えによるものであろう。クラス1では(B)反応が、クラス2では(C)反応が欠損したと考えられる。T3と近縁のファージであるT7のDNA複製が直線的に二方向性をもって複製することから、ワトソンは複製の結果として片方の3'-端が単鎖になっているDNAが合成され、このようなDNAが3'-端の相補的な単鎖配列を介してつながりconcatemer⁽⁹⁾ができることを提唱した。相補的な3'-端ができるだろうということはT3⁽¹⁰⁾ファージのDNAの重複部分の塩基配列の解析からも示唆される。T3の合成直後のDNAはまずDNA-IIの構造(短いconcatemer)となり次にエクソスクレアーゼ(遺伝子6)とDNA結合タンパク質の作用で末端の組換えがおこり、より長いconcatemer(DNA-I)⁽¹¹⁾となると考えられる。長いconcatemerの形成に遺伝子6が必要とされることはT7でも報告されている⁽¹²⁾。

クラス3のアンバー突然変異体即ち遺伝子19欠損ファージではDNA-IはDNA-IIに移行しない。即ちDNA-Iから-IIへの変換には遺伝子19産物が必要だと思われる。遺伝子19産物が働いてDNAが切り出される時合成直後に存在するnickがいったんつながって次いで重複配列の他の端でnickが入り、生じた3'-OHからDNA合成が進んで短いDNAが切り出される。遺伝子19産物によりできるDNAが複製によりできたDNA-IIと同じものであればDNA-IからDNA-IIを経て成熟DNAになると考えられる。

クラス2のアンバー突然変異体感染菌において合成されたDNA-I,-IIはチエイスするとDNA-IIの形で成熟がとまる。クラス2は頭部形成ができない突然変異体であることからDNA-II→成熟DNAの成熟は頭部へのDNA包み込みと密接に関係していると思われる。頭部に包み込まれる時のDNAが-IIの構造とすると遺伝子19産物はまずDNA-1を小さく(だいたい2分子)切り出す。次いでDNA包み込みが進行して重複DNA部分

の両端ではすかいで nicking がおこり生じた 3'-OH 端から DNA 合成が進行して concatemer から DNA を分離すると同時に成熟 DNA ができることがある。

DNA-I から DNA-II への反応は、DNA-II から成熟 DNA への反応が抑制された条件でのみあらわれ通常の DNA 成熟は上に提起した機構により DNA-I の端から 1 分子づつ切り出されている可能性は残っている。また遺伝子 19 産物の作用がそれ自身のもつ活性によるものなのか、又は他の遺伝子産物との共同の働きによるものなのか、今後の問題である。

謝　　辞

この研究は京都大学理学部植物学教室の皆川研究室のファージ・グループでなされた研究の中で、主に私がした事を中心にまとめた。皆川貞一教授・藤沢久雄助教授をはじめ、研究室の皆様には御忠告や討論をしていただきいたことを深くお礼申し上げます。

引　用　文　献

- ① Hausemann, R. (1973) The genetics of T-odd phages. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 51-68.
- ② 松尾尚子, 藤沢久雄, (1972) T3, T7, ファージ. 別冊蛋白質・核酸・酵素, 細菌・ファージ遺伝実験法, 245—251.
- ③ Matsuo, H. and Fujisawa, H. (1973) Studies on bacteriophage T3. I. Kinetic studies on particle formation and role of capsids as intermediates of head morphogenesis of bacteriophage T3. *Virology* 54, 305-312.
- ④ Frankel, F. R. (1966) Studies on the nature of replicating DNA in T4-infected *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 18, 127-143.
- ⑤ Fujisawa, H. and Minagawa, T. (1971) Genetic control of DNA maturation in the process of phage morphogenesis. *Virology*, 45, 289-291.
- ⑥ Hausmann, R. and La Rue, K. (1969) Variation in sedimentation patterns among deoxyribonucleic acids synthesized after infection of *Escherichia coli* by different amber mutants of bacteriophage T7. *J. Virol.* 3, 278-281.
- ⑦ Hershey, A. D. and Melechen, N. E. (1957) Synthesis of phage precursor nucleic acid in the presence of chloramphenicol. *Virology*, 3, 207-236.
- ⑧ Wolfson, J., Dressler, D. and Magazin, M. (1972) Bacteriophage T7 DNA replication: a linear replicating intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 499-504.

- ⑨ Watson, J. D. (1972) Origin of concatemeric DNA. *Nature* (London) New Biol. 239, 197-201.
- ⑩ Fujisawa, H. and Sugimoto, K. On the terminally redundant sequences of bacteriophage T3 DNA. *Virology*, in press.
- ⑪ Fujisawa, H., Yamagishi, M., Matsuo-Kato, H. and Minagnwa, T. (1980) Purification of DNA-binding proteins of bacteriophage T3 and their role in *in vitro* packaging of phage T3 DNA. *Virology*, 105, 480-489.
- ⑫ Miller, R. C., Lee, M., Scraba, D. G. and Paetkan, V. (1976) The role of bacteriophage T7 exonuclease (gene 6) in genetic recombination and production of concatemers. *J. M. Biol.* 101, 223-234.

(本学助教授 自然科学)