

バクテリオ・ファージ T3 の形態

加 藤 尚 子

はじめに

生物学の研究にバクテリオファージ (ファージと略す) を用いる意義については、近年の分子生物学の進歩を見れば言うまでもないことである。それはファージの世代時間が短いことや、遺伝的に単一の多量の標品を得ることができること、及び遺伝情報量が少いということから遺伝的解析がしやすいという大きな利点を持っていることに大きく由来している。ファージは、いわば高等生物の染色体に当たるようなもので、遺伝子と遺伝子を保護する頭部と、増殖するために宿主に寄生しなければならないが、そのための吸着器官である尾部から成り立っている。この非常に小さな簡単な構造をしたファージが宿主である細菌に感染して増殖する過程の解析は分子レベルで行われ、そこで明らかになったことがらは広く生物一般に普遍性を持っていることが明らかになってきた。

T3 は大腸菌 (*Escherichia coli*) を宿主とするビルレント・ファージの中で T 系 (T 1~T 7) に属するものの一つである。正二十面体の頭部と小さな尾部を持っており、頭部の中には分子量が約 25×10^6 ドルトンの二重鎖直線 DNA を一本含んでいる。アンバー突然変異株の分離からわかった遺伝子の数は現在のところ 18 である。DNA の分子量から考えて必須遺伝子の大半を網らしているものと考えられる。今までの研究で明らかになった遺伝子地図及び遺伝子の機能は図 1 に示してある。

ファージの殻はタンパク質でできているので、電子線を透過させてしまうため、そのままの状態では電子顕微鏡で観察することができないのであるが、ネガティブ染色法の開発によって非常にくわしく観察できるようになった。^② ネガティブ染色とは電子密度の高い酢酸ウラニウムやリンタングステン酸などで染めると、染色液がタンパク質のまわりを囲ってタンパク部分が白く浮

Gene	1	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	Lys	19
M.W. (10^{-3})	100	30	65	83	28	68	42	40 45	24	83	13	17	79	156	68		66
DNA	—	—	—	—	II	I	II	II	III	III	III	III	III	III	III	III	I
E.M.	—	○	○	○	○	○	—	—	⬢	⬢	⬢	⬢	⬢	⬢	⬢	⬢	○
FUNCTION	RPase	endo		DPase	exo	head DNA Package -matur	capsid Assem core	assem Major head protein	tail plate		head early stage of infection ?			tail fiber (SBP)	lysis Not lysozy	DNA package -matur	
T7 M.W. X 10^{-3}	100	13.5	67	81	31	62	40	38,45	21	86	14	18	83	150	76		73

図1 T3 ファージの遺伝子とその機能

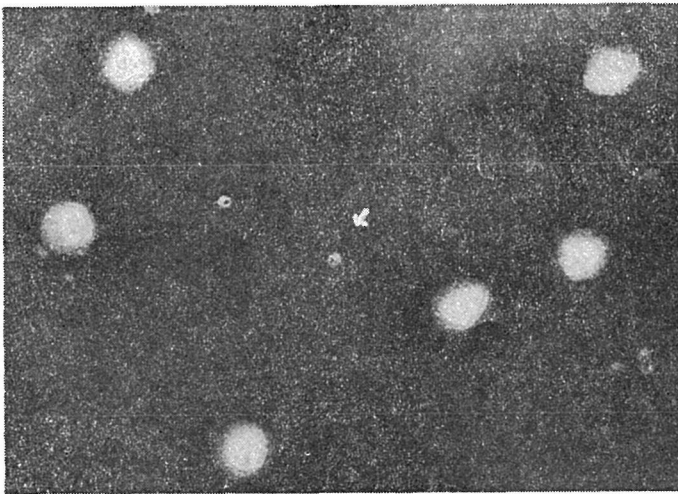


図2 ファージ、からの頭部と尾部 リンタングステン酸染色。
倍率×140,000 白い矢印は尾部。

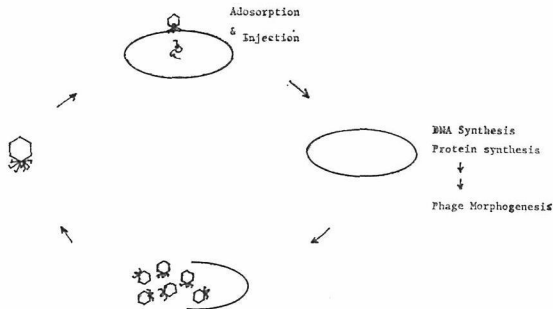


図3 T3 ファージのライフサイクル

き出たように見えるのである。この方法によってフェージの構造が非常にくわしく細部まで観察できるようになった。

これから述べることは、T 3 フェージの構造及び、感染菌内にできるフェージ関連構造体の形態について、ネガティブ染色法により電子顕微鏡観察で得られた結果についてである。

I T 3 フェージの全体の形態

図 2 に示したように T 3 フェージをリンタングステン酸でネガティブ染色して電子顕微鏡で見ると、正六角形の頭部に小さな尾部がついているのが見える。頭部は立体的には正二十面体構造をしていることがわかっている^③。ネガティブ染色なので白く見えるのが DNA のつまった頭部で内部も黒く見えるのは、DNA が抜けてしまった頭部である（色素が頭部の中に入って黒く見える）。白い矢印で示したのは、後に述べる尾部である。尾部には 6 本の tail fiber がついている。

II T 3 フェージのライフサイクル

T 3 フェージは大腸菌の細胞壁に尾部で吸着して DNA を細胞質中に注入する (図 3, 4)。フェージ DNA が注入されると今まで大腸菌の遺伝情報に沿って行われていた DNA 合成、タンパク合成、RNA 合成など大腸菌の高分子合成が停止して、全てフェージ DNA の情報に沿った DNA 合成、タンパク合成、RNA 合成が行われるようになる。この時期は大腸菌を超薄切片にして電子顕微鏡で観察しても形態的にはフェージ粒子が見えず、暗黒期と呼ばれている。T 3 の場合 30°C で 20 分程するとフェージ粒子が現われ、最終的には大腸菌の細胞壁が溶かされて、大量のフェージが出てくる。だいたい 30°C で 40 分程すると 1 つの大腸菌一個体当たり 100~300 個体のフェージができる。

III T 3 フェージの関連構造体

上述のようなフェージの増殖過程にみられるフェージの DNA、タンパク、RNA の合成は厳密な調節機構のもとに経時的に起る。DNA 合成は 30°C で 10 分目に始まり、12 分ぐらいからフェージ粒子の構造タンパク（頭部タンパク、尾部タンパク）が合成され始める。それに引き続いて、合成された DN

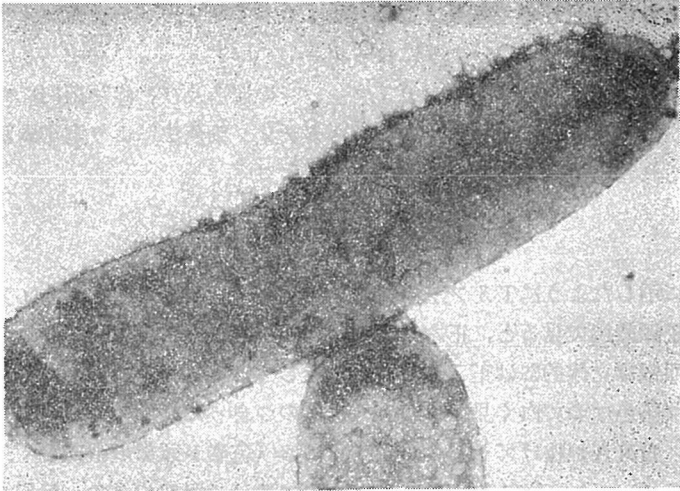


図4 T3 ファージの吸着とDNA注入 酢酸ウラニウム染色。
倍率×28,000

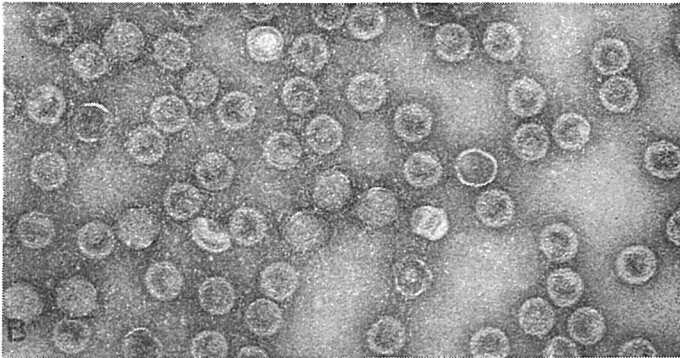


図5 頭部前駆体 (prohead)
少し丸味をおびて見えるのが prohead 六角形に見えるのが
ファージ。倍率×80,000

Aと構造タンパクが集合してファージ粒子をつくる形態形成過程がみられる。この形態形成過程の研究には、途中までしか形態形成が進まない突然変異株を用いると便利である。即ちこれらの突然変異株感染菌においては、いろいろな中間体がたまるので、これらの中間体を分析することにより、形態形成の過程を組み立てることができるのである。

a. 頭部前駆体 (prohead)

ファージ感染後、合成されたファージ・タンパク質を放射性アミノ酸で標識して一定時間後に溶菌して溶菌液を 10—30 % の蔗糖密度勾配遠心法で分画すると、合成直後のタンパクはファージ粒子より少しゆっくりと沈降する構造体のなかに入る。この構造体を電子顕微鏡で観察すると図5のように、ファージよりは心もち小さく丸味を帯びた形をしており、内部に核のようなものが見える。この構造体はDNAを含んでおらず、DNA合成のない状態で蓄積しDNA合成を開始させると合成されたDNAがその中に包み込まれて頭部になる。このような実験からこの構造体は頭部前駆体と結論された。したがって prohead はDNAがその中に入る時に何らかの構造変化があるものと思われる。^⑤最近 prohead が精製され試験管内 (*in vitro*) でDNAが入ってファージになることが示された。^⑥

b. polyhead

図6に示すように、DNA合成を欠損した突然変異株 (遺伝子3) 感染菌には頭部タンパクが異常に集合した polyhead と呼ばれるものが見えることがある。これは頭部が丸くならないで長く伸びたものと考えられる。^{⑤⑧}この polyhead は *in vitro* での再構成実験でもできることが示された。^⑦

c. 頭部 (head)

尾部遺伝子が欠損している突然変異株 (遺伝子11, 12) 感染菌においては尾部のついていない頭部が蓄積する (図7)。この頭部は試験管内で尾部タンパクを加えると感染性ファージになるので、形態形成の中間体と考えられる (図8)^⑧。即ち頭部が尾部構造とは独立に完成することを示す。

d. 尾部 (tail)

頭部をつくらない突然変異株 (遺伝子9, 10) 感染菌においては、おもしろいことに尾部タンパクは尾部構造をとらない。このことは尾部形成が完成した頭部の上で行われることを示す (未発表)。尾部を取り出すには精製したT3ファージを50%蔗糖につけて 37°C, 24時間ほど静置する。尾部やDNA

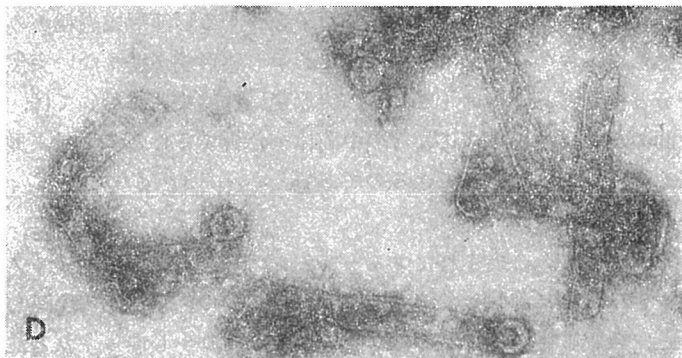


図6 polyhead
DNA合成の突然変異株 amNG 69 (遺伝子3) 感染菌を
溶菌して精製。倍率×80,000

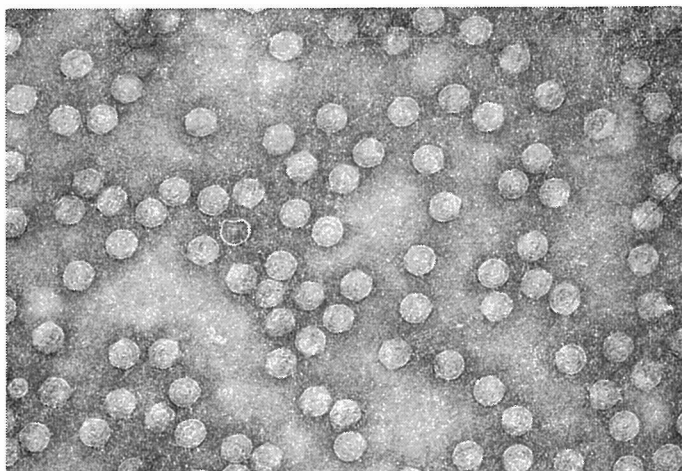


図7 頭部
尾部の突然変異株 amNG 7 (遺伝子11) 感染菌を溶菌し
て頭部を精製した。倍率×53,000

が抜けた空の頭部と尾部が電子顕微鏡で観察される(図1)。10—30%蔗糖密度勾配遠心法で分画して尾部分画を取り出したのが図9である。尾部を横から見ると図10a, 上から見ると図10bのように見える。図10bから尾部には tail fiber が6本ついているのがわかる。

以上の観察結果から考えたT3フェージの構造は図11のようである(DNAの抜けた状態の図)。

おわりに

T3フェージをDNAとタンパク殻に分けて、さらにタンパク殻をタンパク分子にまで解離し、もう一度再集合する条件を検討したが polyhead^⑦ ができるが prohead やフェージ様構造をつくることができない。例えばタバコモザイク・ウイルスなどは再集合が可能である^⑧。このような集合を自己集合(self assembly) というが、T3頭部の集合は単なるタンパクの自己集合ではないのだろうと思われる。しかし polyhead ができるということは頭部構成タンパクは自己集合して筒状構造をつくり得るということであるから、長くならないで丸くする機構が感染菌内にあるということである。T3の prohead には prohead にはあるが完成した頭部タンパクにはないタンパクが、知られており、そのタンパクの頭部形成における役割は興味深い。またいくつかのフェージで宿主機能がフェージの粒子形成に関与することが知られている。

これまで述べてきたようにフェージの形態形成の研究に遺伝学的手法が有効であるばかりでなく、フェージの構造と遺伝子との対応を明確にするという大きな利点がある。今の所ははっきりしているのは tail fiber (遺伝子17) だけであるが、今後はDNAを出したり、尾部をはずしたりすることにより、フェージの細部の構造と、それを構成するタンパクを解析し、それらを支配する遺伝子を同定することが大切であろう。又、フェージ粒子が宿主に吸着し、DNAを細胞内に注入して感染過程を開始する際に、フェージ粒子の構造やそれを構成するタンパクがどのような役割をもっているのかということは興味深いことである。

謝辞

この論文は京都大学理学部植物学教室の皆川研のフェージグループでなさ

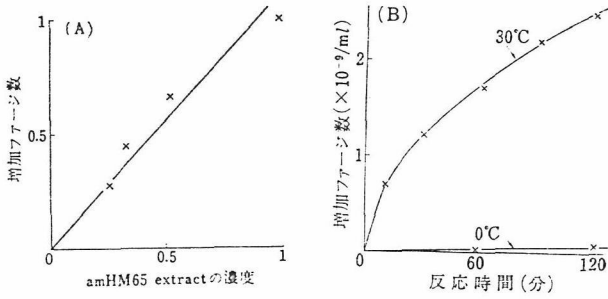


図8 extract complementation
 (A) 尾部供与体の濃度と形成されるファージ数の関係
 (B) extract complementation の温度依存性

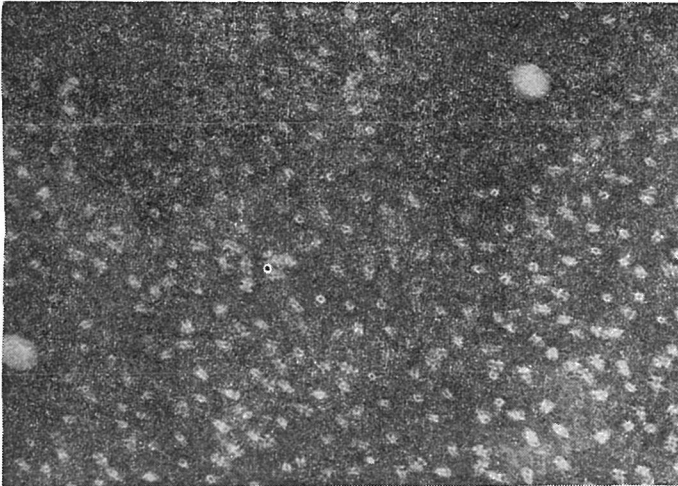


図9 尾部
 T3 ファージを蔗糖ショックで尾部をはずして精製した。
 倍率 $\times 105,000$

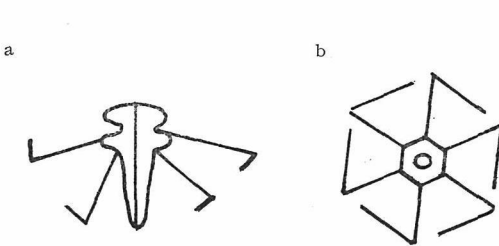


図10 a 尾部を横から見て描いた図
 b 尾部を上から見て描いた図

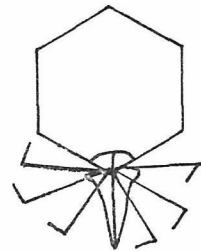


図11 DNAが抜けた T3 ファージの全体図

れている研究の中で、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いたことを厚くお礼申し上げます。

(本学専任講師 自然科学)

引用文献

- ① 藤沢久雄, 宮崎純一, 加藤尚子, 皆川貞一, ウィルス学の進点 第17回ウィルスシンポジウム記録, 京都大学ウィルス研究所編, 162, (1977)。
- ② Brenner, BBA, 34, 103, (1959).
- ③ Caspar, D.L., and Klug, A., Cold Spring Harbor Sympo. Quant. Biol., 27, 1 (1962).
- ④ 松尾尚子, 藤沢久雄, 別冊蛋白質・核酸・酵素, 細菌・ファージ遺伝実験法, 245, (1972)。
- ⑤ Matsuo-Kato, H., and Fujisawa, H., Virology, 63, 105 (1975).
- ⑥ Miyazaki, J., Fujisawa, H. and Minagawa, T., Virology, in press.
- ⑦ Fujisawa, H. and Matsuo, H., Virology 54, 313 (1973).
- ⑧ 藤沢久雄, 松尾尚子, 蛋白質・核酸・酵素, 18, No. 6, 594, (1973).
- ⑨ Fraenkel-Conrat, H., and Williams, R. C., Proc. US Nat. Acad. Sci., 41, 690 (1955).