

バクテリオファージのコネクターの 存在様式と役割について

加藤 尚子

はじめに

バクテリオファージは細菌を宿主とするウイルスである。いろいろな細菌で種々のファージが発見されているが、ここでは大腸菌を宿主とするT系ファージの中で主にT3ファージについて述べたいと思う。

T3ファージは一本の二本鎖直線状のDNAを遺伝子とするファージである。図1に示すようにその構造はDNAを含む正20面体のタンパク質の殻(頭部)と、DNAを宿主に注入するための器官である尾部及び宿主への吸着器官である6本の尾部繊維から構成されている。頭部と尾部の連結部にはコネクターと呼ばれる構造がある。T3のコネクターは遺伝子8でコードされるタンパク質(gp8)の12量体で構成され、真中に穴をもつ6回対称のリング状の構造をしている(図2)。一般にコネクターは種々のファージにおいて、①単一のタンパク質で構成されている、②12量体である、③真中に穴があるリング状をしている(6回対称性)、以上のような共通性を有している⁽¹⁾。

コネクターのこの共通性は、それがファージの生活環において重要な役割を荷っていることを示している。

T4ファージでコネクターをつくるタンパク質(gp20)が欠損している条件致死突然変異体感染菌ではファージ頭部の形成が阻害されることが報告されている⁽²⁾。T3ファージでも遺伝子8の突然変異体感染菌で頭部前駆体(プロヘッド)様の構造ができるがコネクタータンパク質(gp8)を欠いており、DNA包み込みもできないし、あとからgp8を取り込むこともできない非正常な構造である⁽¹⁾。これらの事実はコネクターがプロヘッド形成及びDNA包み込み反応に重要な役割をはたしていることを示している。又、コネクターは頭部と尾部の連結部に存在することはT3ファージからショ糖浸透圧ショックによって尾部を切り離すと、尾部にコネクターが結合していることから示された⁽³⁾。そして又、尾部繊維によって宿主の細胞膜に吸着したファージは尾部を介してDNAを細胞内に注入する。

これらの事実からコネクターについては、④プロヘッド形成、⑤DNA包み込み反応(DNA packaging)、⑥頭部-尾部の連結(head-tail connection)、⑦DNAの宿主への注入(DNA injection)とファージ形成の全般に渡って重要な役割をはたしていることが示唆される⁽¹⁾⁽⁴⁾。

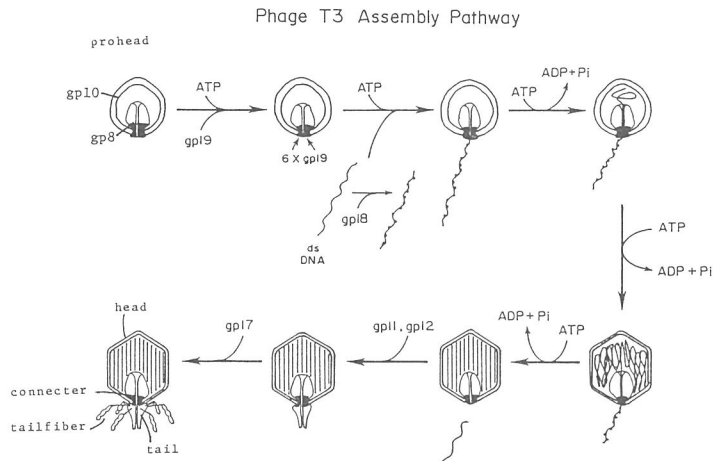


図1 T3ファージ形態形成過程

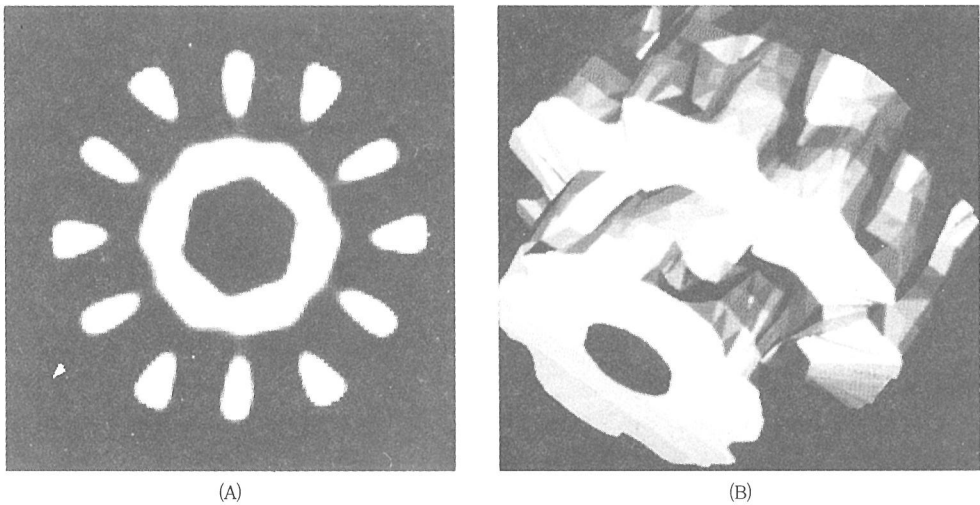


図2 T3ファージ・コネクターの構造図
(A)2次元像 (B)3次元像

ここでは、㊸プロヘッド形成と、㊹DNA包み込み反応におけるコネクターの役割について予備的な実験結果の報告とあわせて述べてみたいと思う。

a) プロヘッド形成

図1にT3ファージの形態形成過程を示す。ファージの形態形成は基本的には頭部・尾部・尾部繊維が各々独立に形成されて後、頭部に尾部が結合し、尾部に尾部繊維が結合して成熟ファージになると考えられている。頭部形成はまず頭部前駆体（プロヘッド）が形成さ

れ、その中にDNAが包み込まれて頭部（ヘッド）ができる過程をいう。即ちこの過程は、
a) プロヘッド形成、及びb) DNA包み込み反応の2つの過程を含んでいる。

i) プロヘッドの構造

T3プロヘッドの構造はその頭殻が頭部主要タンパク質（gp10）で構成され、成熟頭部に比べて大きさが小さく丸味をおびた形をしている（図3）。またその内部には成熟頭部には含まれていないがプロヘッド形成に必須の足場タンパク質（scaffolding protein）が含まれている。足場タンパク質というのはプロヘッド形成には必要であるが頭部完成後には除かれるという意味で名付けられた。T3の場合プロヘッドはDNA包み込み反応の直接の前駆体となるので、足場タンパク質（gp9）の除去はDNA包み込み反応中であると考えられる。

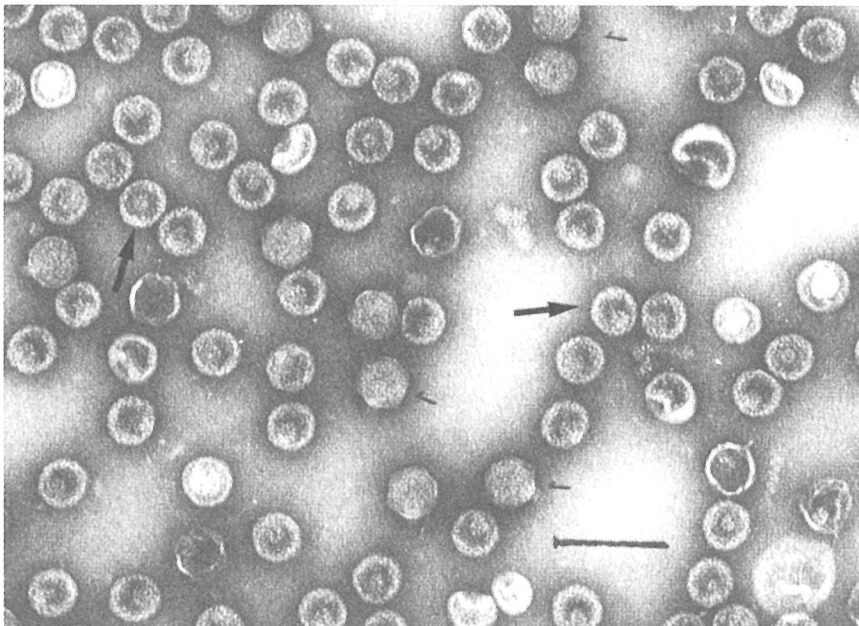


図3 T3ファージの成熟ファージとプロヘッド
小さい矢印; 成熟ファージ
大きい矢印; プロヘッド
スケールは1 μ m

T3プロヘッドは正20面体構造をしているので20の面と12の頂点をもつと考えられている。12の頂点の一つがコネクターで占められており、ここからDNAが注入されて後、ここに尾部が連結するものと考えられていた（図1）。なぜならファージ頭部のDNAは尾部を介して宿主に注入されるのでDNAの端が尾部近くにあることは都合の良いことであるからである。

しかし加藤らのT4プロヘッド試験管内再構成実験の結果では、最初に形成されたプロ

ヘッドの12の全ての頂点に、コネクターが結合していることを示唆していた⁽⁶⁾。この結果は従来の定説と全く異なる点なので、T3ファージのプロヘッドについても検討してみなければならぬ問題である。

以前T3の遺伝子6のアンバー突然変異体感染菌から精製されたがDNA包み込み反応性を失っていたプロヘッドを電子顕微鏡で観察したところ、プロヘッドのまわりに多数のコネクターが散在しているのが見つかった。(図4)⁽⁷⁾。コネクターの数は一つのプロヘッドに一つしかないとする散在しているコネクターは多すぎるように思われた。一般にコネクターは阻水性の部分を持っているので、集合しやすく又、ガラス管などの器壁に吸着しやすい性質があってすぐに溶液から消えてなくなってしまう性質がある。この事実と合わせて考えると一つのプロヘッドから多数のコネクターが放出された可能性がある。プロヘッドをよく観察してみるとプロヘッドの数か所に穴が見られ(図4矢印)、内部の構造は外に出てしまっただけ空になっている。外殻が正常なプロヘッドにくらべて、うすくなり構造変換しているものもある(図3、4)。この現象は自然発生的に起り(冷蔵庫に保管している間に起こった)、起る原因についてはよくわかっていない。残念ながらコネクターの器壁などへ吸着してすぐになくなってしまふ性質のためと思われるが、プロヘッドの構造変換とコネクターを同時に観察できたのはこの一回だけである。他はいつも空のプロヘッドと少数のコネクターを観察できるだけである。

プロヘッド内部には足場タンパク質(gp9)の他に感染初期に働くと考えられている宿主へのDNA注入に関係するタンパク質(gp13, 14, 15, 16)が含まれているが、これらのタンパク質は成熟頭部にも含まれており、又これらのタンパク質が欠損してもプロヘッド及び成熟頭部の構造形成には支障がないことからプロヘッドの形成には関係しない⁽⁷⁾。ただgp8(コネクター)が欠損しているプロヘッドはgp9とともにこれらのタンパク質も同時に失われていることが多い⁽¹⁾。

ii) プロヘッド形成

コネクターの突然変異体感染菌の解析からプロヘッド形成の初期にコネクターが中心的役割をもつことが示唆されたがどのようにプロヘッド形成が開始されるかは不明であった。この反応の解析には*in vitro*再構成実験が有効であるとして、いろいろと試みられたがコネクターが自分自身で集合してしまうことや器壁に吸着して失われる等の困難があって成功していなかった。加藤らはT4ファージ感染菌からコネクター複合体を分離精製し、プロヘッドを尿素で変性分解して得たプロヘッドタンパク質混合液と混ぜて20℃で一晩静置した。これを電子顕微鏡で観察したところプロヘッド様の構造が多数できていることがわかった⁽⁶⁾。この結果はコネクター複合体にはプロヘッド形成を開始する能力があることを示している。

コネクター複合体を電子顕微鏡で観察したところ、リング状の構造の周囲に6本の繊維状構造がみられた。*in vitro*再構成実験で得られたプロヘッドをよく観察してみると、プロヘッドの頂点に繊維状構造が発見された。実験に用いたコネクター複合体が繊維状構造をもつことと考え合わせると、再構成されたプロヘッドは一つの頂点だけでなく他の全ての頂点

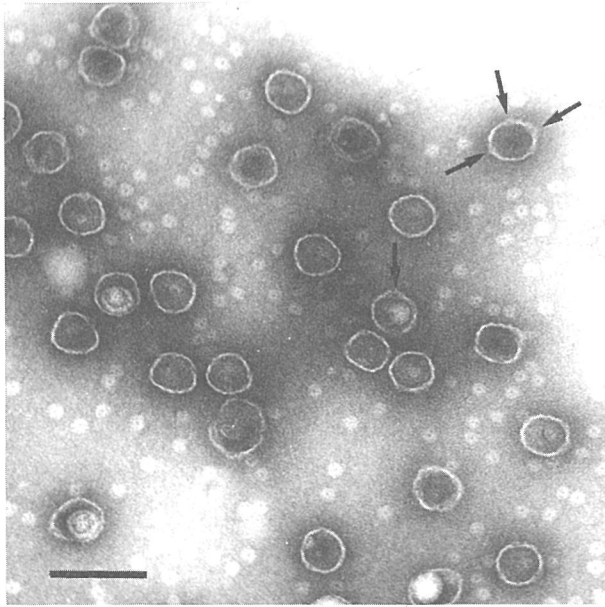


図4 失活したプロヘッドとコネクター
 矢印; プロヘッドの頂点にある穴
 多数の小さなリング状構造がコネクター
 スケールは2 μm

にもコネクターが結合している可能性が考えられた。この可能性を確かめるために今度はT4 感染菌から得られたプロヘッドに抗gp20血清—金コロイドを反応させる実験が行われた。抗gp20血清がT4 コネクターと反応して結合すると抗血清に結合している金コロイド粒子で見分けることができる。図5の結果が示すようにプロヘッドに複数の金粒子が結合している。特にT4 プロヘッドは少し縦長の構造をしていて、従来コネクターは基頂点と呼ばれるプロヘッドの基部の位置にあるとされているので、金粒子がつく位置は一か所の決った所しかないはずである。結果はプロヘッドのいろいろな頂点にランダムに金粒子がついているので、これもコネクターが全ての頂点に結合しているという推論を支持しているようである⁽⁶⁾。

T4 プロヘッド形成はまずプロヘッド内部の核構造 (core) と呼ばれる構造がコネクターとコアタンパク質によって形成され、このコアのまわりに外殻タンパク質がコネクターを起点として集合することによってプロヘッドができると考えている⁽⁶⁾。

b) DNA包み込み反応

二重鎖DNA フェージのDNA包み込み反応は全てのフェージにおいて共通であると考えられている。DNA包み込み反応には二種類の包み込みタンパク質とATPが要求される。T3の場合はgp18とgp19である。gp19はT3 プロヘッドのコネクターに結合し、gp18はD

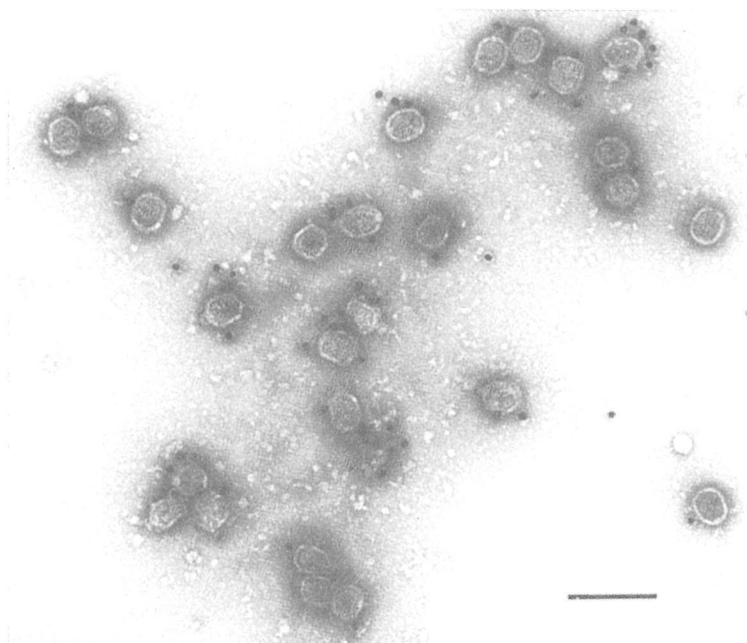


図5 T4ファージのプロヘッドの抗gp20血清・金コロイドによる標識
スケールは0.2 μ m

NAと結合して、それらが集合して50 s-複合体と呼ばれる「包み込み前駆体」を形成し、つづいてプロヘッド内へのDNA移送がATPの加水分解によるエネルギーを使って行われる⁽⁸⁾。

gp19がプロヘッドのコネクターに結合するという点については次のような実験結果がある。gp19は集合して大きなかたまりをつくりやすい。プロヘッドとgp19を混ぜて電子顕微鏡で観察するとこの大きなかたまりの上にプロヘッドがたくさん結合しているのが見られた。遺伝子8（コネクター遺伝子）の欠損した感染菌から得られたプロヘッドを用いた場合にはgp19のかたまりに8⁻プロヘッドが全然結合していないことから、gp19はプロヘッドのコネクターに結合するものと考えられる（加藤尚子、未発表）。（gp19はATPが存在するとかたまりにならないので、DNA包み込み反応の条件ではgp19の大きなかたまりは見られない。）

T3 DNA包み込み実験ではT3 DNAの $\frac{1}{4}$ 長が頭殻内に移送されるとプロヘッドの構造変換が起り⁽⁹⁾、拡大されて内部の足場タンパク（gp9）が流出すると考えられている。もしプロヘッドの全ての頂点にコネクターが結合しているとするとこの構造変換の前に基頂点のコネクターを残して他のコネクターの切り離しが起こり、そこから足場タンパク質の流出が起ることが考えられる。この可能性については調べている最中で今後の課題である。

T3の *in vitro* 包み込み反応において、用いるDNAは別にT3 DNAに限らず、DNA

特異性は⁰⁹ない。又、DNAの長さもT3 DNAより短かくても長くても包み込まれる。即ち短い場合は何本ものDNAが包み込まれ、長い場合は外からはみ出したDNAを切り取られない限り、はみ出した状態でとどまると考えられている（もしDNAがT3 DNAの特異的な末端配列をもっているとそこで切り取られる）。又、DNAの長さをT3 DNAの $\frac{1}{10}$ 長とか $\frac{1}{6}$ 長ぐらいにすると、 $\frac{1}{6}$ 長ぐらいだと6本のDNAが包み込まれる。即ち頭いっばいのDNAが包み込まれるのである。そして包み込まれるDNA量はT3 DNAにくらべて効率が良い。この結果から私はDNAが入るためのプロヘッドの入口（コネクター）が一つしかないとするよりは、たくさんある方がこの事実を都合よく説明できるのではないかと考えている。DNA包み込み反応とプロヘッドのコネクターについてはさらに研究しなければならないことが多いと思われる。

T3のコネクターの電子回折の実験からコネクターの穴の直径が成熟頭部のコネクターではDNA通過を許さない程小さい事が判明した。¹⁰成熟頭部のコネクターはすでにDNAが通過した後なので、いったんDNAが通過してしまうとコネクターの構造変換が起り、DNAが飛び出さないように穴が閉じてしまうのではないかと考えられた。そこでDNAが通過していないコネクターが、遺伝子8をクローニングした大腸菌から精製され、同じく電子回折で調べられた。結果は予想通り、穴はDNAが通過できる程度に開いていた。¹¹これらの結果は、DNA末端の通過がコネクターの閉鎖を引き起こすと考えることができる。もしそうならば入口が一つとしたら、何本ものDNAが包み込まれるという事実と矛盾する。もし頭いっばいにならなければDNA末端が通過しても閉鎖しないとすれば、T3 DNAの $\frac{1}{4}$ 長が入って頭殻の構造変換が起っているのに頭部構造変換前と同じように「包み込み前駆体」を作ってDNAが移送されるという一連の反応が引き続き起ると考えなければならない。このような事は考えにくいことなのでプロヘッドには入口（コネクター）が一つではなく、たくさんあると考えた方が良いのではないかと考えている。

多くのフェージで包み込みタンパク質がコネクターと結合すること、ATP加水分解とDNA移送が共役することから次のような三つのモデルが提出されている。(A)移送装置は一般種のトポイソメラーゼ活性をもち、ATP消費によりDNAに超らせんを導入してDNAをたぐりよせるように移送する。¹²(B)ATPのエネルギーによりコネクターが回転しDNAの溝を利用してボルターナットの関係でDNAが移動する。¹³(C)ATPの結合と分解による除去に伴う移送装置の構造及びDNAとの相互作用の周期的変化を介してDNAを移送する。¹⁴モデル(A)はニックや鎖間架橋をもつDNAが移送されるという事実と矛盾する。現在のところ、どのモデルが妥当かについてはまだわからない。

おわりに

コネクターがフェージの生活環においてはたす役割の中で特にプロヘッド形成とDNA包み込み反応における場合について述べた。

フェージ頭部の前駆体であるプロヘッド形成の初期にコネクターは働いている。コネク

42 バクテリオファージのコネクターの存在様式と役割について

ターが欠損しているとプロヘッド形成が阻害されたり非正常なプロヘッドしかできない。次にコネクターはプロヘッド内へのDNA移送の入口になる。プロヘッド内に入ったDNAの末端はコネクター付近にとどまっている。ここに尾部が連結し (head-tail connection; ここからコネクターの名がつけられた)、ファージが宿主にDNAを注入するときはDNAがコネクターから尾部を通して細胞内へ入っていくのである。

ここではプロヘッドに存在するコネクターが従来考えられていたようにプロヘッドの基部に位置するだけでなく、12の頂点全てに存在するのではないかということについて、プロヘッド形成とDNA包み込み反応でのコネクターの役割と関連して考察した。今後さらに研究を進めてこの推察が正しいかどうか検証したいと思っている。

引用文献

- (1) Bazinet, C. and King, J. : *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 109(1985).
- (2) Laemmli, U. K.: *Nature(London)* 227, 680(1970).
- (3) Matsuo-Kato, H., Fujisawa, H. and Minagawa, T. : *Virology* 109, 157(1981).
- (4) 藤沢久雄、加藤尚子 : 日本電子顕微鏡学会 24, 191(1990).
- (5) Matsuo-Kato, H. and Fujisawa, H. : *Virology* 63, 105(1975).
- (6) Kato, H. and Bashong, C. 未発表。
- (7) 加藤尚子 未発表。
- (8) Shibata, M., Fujisawa, H. and Minagawa, T. : *Virology* 159, 250(1987).
- (9) Shibata, M. Fujisawa, H. and Minagawa, T. : *J. Mol. Biol.* 196, 845(1987).
- (10) Hashimoto, C. and Fujisawa, H. : *Virology* 166, 432(1988).
- (11) Donate, L. E., Herranz, L., Secilla, J. P., Carazo, J. M., Fujisawa, H. and Carrascosa, J. L. : *J. Mol. Biol.* 201, 91(1988).
- (12) Fujisawa, H. and Carrascosa, J. L. : 未発表。
- (13) Black, L. W. and Casjens, S. R. : *Cell* 21, 319(1980).
- (14) Hendrix, R. W. : *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 75, 4776(1978).
- (15) Fujisawa, H., Hamada, K., Shibata, H. and Minagawa, T. : *Virology* 161, 228(1987).