

# バクテリオファージ T4 の頭部形態形成

加 藤 尚 子

はじめに.....	3
バクテリオファージの構造.....	4
ファージの生活環.....	5
ファージ形態形成.....	7
ファージ頭部形態形成.....	9
1) 頭部関連構造体 .....	9
2) 宿主遺伝子の関与 .....	11
3) プロヘッド .....	15
4) プロヘッド形成の開始.....	18
5) in vitro ポリヘッド形成 .....	20
6) in vitro プロヘッド形成 .....	22
7) in vitro ポリコア (polycore) 形成 .....	23
8) gp20 複合体の分離 .....	24
9) gp20 複合体による in vitro プロヘッド形成 .....	26
10) gp20 複合体による in vitro での core 形成 .....	29
11) プロヘッド形成過程のモデル .....	30
12) プロヘッドの形の決定.....	33
13) DNA パッケージング (DNA 詰込み反応) .....	38
14) 頭部の完成 .....	39
おわりに.....	40

## はじめに

現代物理学の一応の成果を見た一部の物理学者たちが物理学の知識や方法論で生物の本性を探索しようと始めたのが分子生物学の始まりである。現代物理学の法則が生物においても成り立ち、それによって物理学や化学の方法や、考え方で生物を理解しようとする試みであった。彼等が生命現象の解明のために選んだのは、生物として最も単純なバクテリオファージや細菌であった。結果的に現在の分子生物学の隆盛を見る限り彼等の鋭い直感が当たっていた事に感嘆させられる。

分子生物学の歴史のなかで明らかになった事は、生物の本性はその遺伝情報にあり、生命活動の本質的なところはバクテリオファージを含めて高等生物まで同じであるということである。これはこの地球上の全生物が一つの始源生物より進化したものである事を示している。そしてこれまで各々別々に発展してきた進化学、分類学、生態学、生理学、発生学など生物学の各分野が共通の認識に立って考える事ができるようになったのである。すなわち分子生物学の成果によって生物学の各分野が共通の基盤を持つようになり、各分野は今ものすごい勢いで発展し続けている。

ウイルスはまさに遺伝情報のみを持つ生物である。もちろん情報だけだと録音されたカセットテープと同じでそれだけでは情報の発現はできない。バクテリオファージが発現できるのはカセットデッキの役割をする宿主細胞の中だけである。しかし結局生物は遺伝情報を発現する時期（体細胞期）と情報を次代に伝える時期（生殖細胞期）を繰り返しているのであって永続しているのは遺伝情報のみである。遺伝情報の永続性と個体維持での役割を明らかにした事でファージや細菌の研究は生物学において普遍的な成果を上げたと言える。

バクテリオファージを用いた研究では主に遺伝情報とその発現、すなわち蛋

白質の機能と発現の調節が明らかにされている。蛋白質の機能の一つの例としてファージの構造がどのようにしてできるかを明らかにするのが形態形成の研究である。ここではバクテリオファージの研究の中から私も従事した T3 や T4 ファージの頭部形態形成について述べたいと思う。

### バクテリオファージの構造

バクテリオファージは細菌に感染するウイルスである。ファージは、遺伝子である核酸が DNA か RNA か、あるいは DNA が二重鎖直線状か一重鎖円環状かなど、あるいは宿主の DNA の中にファージ DNA が入り込んでいる溶源ファージか、それとも溶源化しないかなどにより分類する事ができる。ここでは大腸菌に感染するファージで T 系 (T1 ~ 7) に属する T3 と T4 について述べる。

図 1 に示すようにその構造は頭部と尾部からなり、尾部には尾部繊維が付い

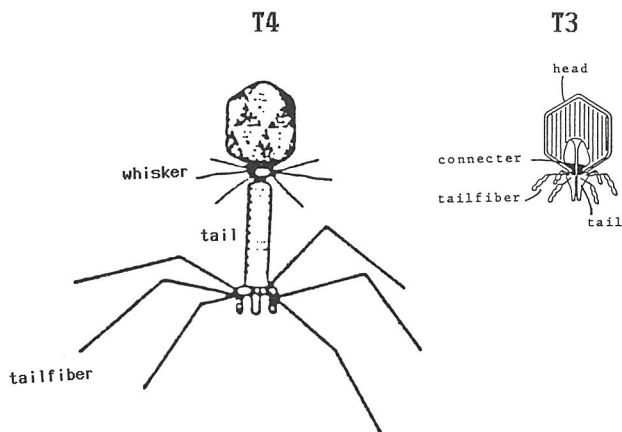


図 1 T4 および T3 ファージの構造



ている。頭部には DNA が含まれており、頭部の役割は遺伝子の保護である事が分かる。尾部繊維は宿主への吸着器官であり、尾部は遺伝子である DNA を宿主に注入するための器官である。遺伝子は 1 本の二重鎖直線状の DNA であるが T3 では DNA の両端が定まっているのに対して、T4 では定まっておらず circularly permuted (DNA の始めと終わりが個々のファージで少しずつ<sup>(1)(2)</sup>れているので遺伝子地図を作ると地図が環状になる)の状態になっている。T3 の遺伝子は現在20、T4 では150ほどの遺伝子が知られている<sup>(3)</sup>。T3 では直線の、T4 では環状の遺伝子地図が作られている。T3 DNA の大きさは約38,000塩基対、T4 は166,000塩基対である。現在のところ T3、T4DNA とともに部分的には分かっているがその全塩基配列はまだ決められていない。頭部は T4 では縦長の二十面体構造をしているが T3 では正二十面体である。尾部繊維は直接宿主に吸着する器官なので宿主認識能を持ち、またこの器官が抗体でブロックされると宿主に吸着できなくなるのでファージの感染性が失われる<sup>(4)</sup>。

T4 の構造は T3 よりも複雑で、いわば T3 の構造にさらに収縮性のある尾部及び長い 6 本の尾部繊維が付け加わったような構造をしている。頭部構造が二十面体になっているので 5 回対称性であるが尾部や尾部繊維の構造は 6 回対称性を持っている。

## ファージの生活環

ファージの生活環は宿主に感染して子孫を増やす増殖期と、宿主外で単独で存在する休止期の二つの状態がある(図2)。ウイルスの特徴であるが、ファージも宿主に感染するとその姿を失い細胞の中に溶け込んでしまったようになる。実際はファージの DNA が存在していてファージの増殖に必要な蛋白質や DNA を作るために宿主の細胞の機構が全てファージ生産用に変えられるので

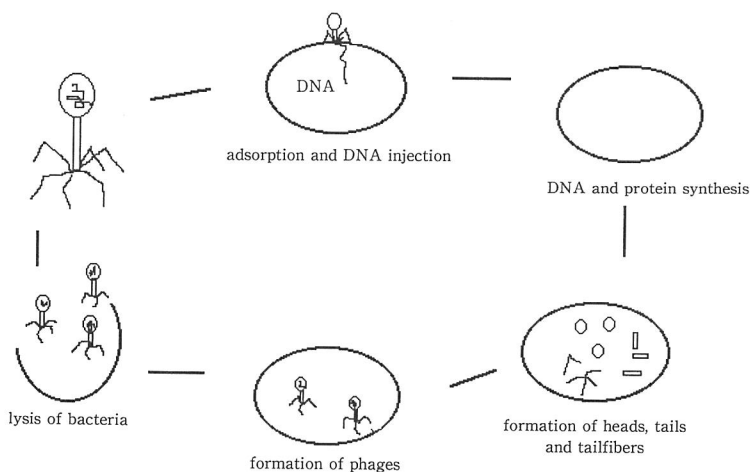


図2 T4 ファージの生活環

ある。

ファージの感染は細胞膜への吸着で始まる。吸着したファージは尾部が収縮して (T4) 頭部から DNA が細胞内に進入する。このとき DNA と数個の蛋白質のみが入り、細胞の外にはファージのぬけがらが残る。この事実は歴史的には DNA が遺伝子であるという大きな証拠となったのである。<sup>(5)</sup>

ファージ DNA が細胞内に入ると数分以内に細胞の DNA 合成及び蛋白合成は止り、細胞 DNA の崩壊が起る。ファージ DNA の指令の元、タイムスケジュールどおりにまず DNA 合成に必要な蛋白質が合成され、DNA 合成が始まり、頭部や尾部などのファージ構造蛋白質が作られて、1 細胞あたり 100 から 200 の子ファージが作られる。これに要する時間は 37 度で約 10 分から 15 分である。子ファージができると酵素リゾチームが働いて細胞膜を溶かし、大量の子ファージが細胞外に出てくる。<sup>(3)</sup>

## ファージ形態形成

Crick and Watson (1956) はウイルスが持っている少ない情報量でウイルス構造を作るには1種類か数種の少種類の蛋白質で球状や螺旋状の対称的な構造を作る事により可能である事を示した。これらの構造は当該蛋白質だけの自己集合 (self assembly) で作られる。その後球状ウイルスの頭部は正二十面体である事が Caspar and Klug (1962) によって示された。<sup>(6)(7)(8)</sup>

分子生物学は大腸菌とそれに感染するファージの研究で始まったが、これらの生物で条件致死突然変異体が分離された事が発展の大きな原動力になった。<sup>(9)</sup> T4 ファージの頭部遺伝子のアンバー突然変異体 (amber mutant) 感染菌ではランプ、ポリヘッドやタウパーチクルと呼ばれる頭部の異常な形態が観察された。<sup>(10)(11)</sup> これらの異常な形態は頭部形成の過程で頭部関連遺伝子が欠損しているためにそこで形成が止ってしまったもの、あるいは横道に反れてしまったものと理解された。このことは T4 のような複雑なファージでは構造蛋白質による単なる self assembly で頭部が形成されるのではなく多くの蛋白質の関与と段階的な形成を必用としている事を示している。

1966年に Edgar and Wood は色々な T4 アンバー感染菌の溶菌液を in vitro (試験管内で) 組み合わせる事により感染性のあるファージを作る事ができる事を発見した。<sup>(12)</sup> この実験結果は頭部の遺伝子の変異したファージは正常な尾部を作る事ができるし、尾部の変異したものは正常な頭部を作る事ができ、それらは in vitro で混ぜ合わされると結合して感染性のあるファージになる事を示している。すなわち頭部や尾部、尾部繊維などファージ構造は別々のルートで作られることを示している(図3)。<sup>(13)</sup> これらの構造の形成過程のうち頭部について次に述べたいと思う。

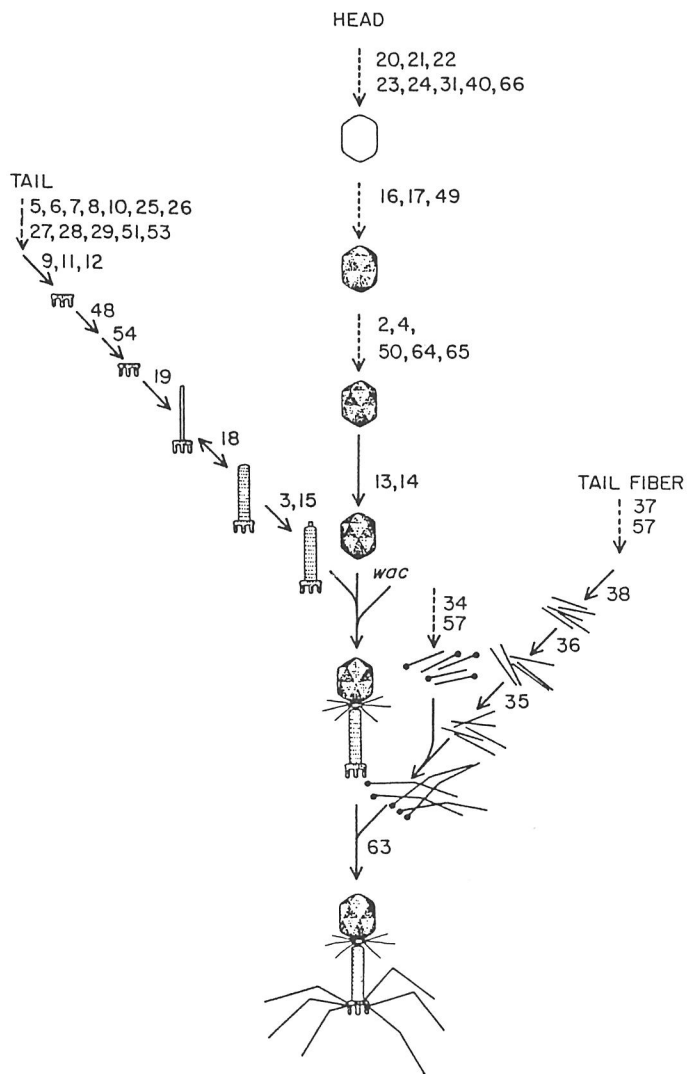


図3 T4 ファージの形態形成過程<sup>(13)</sup>  
(数字は遺伝子を示す)

## ファージ頭部形態形成

### 1) 頭部関連構造体

T4 頭部遺伝子の条件致死突然変異体が大腸菌に感染させると色々な頭部関連構造が見られる。この事実から逆に頭部に関係する遺伝子が同定できるのであるが、これらの研究から多くの遺伝子の関与の元に頭部が形成されるということが理解される。

遺伝子31が欠損している T4 感染菌では頭部主要蛋白質 gp23 が大きな塊 (lump) となりどんな頭部関連構造も形成されない<sup>(14)</sup>。正常な T4 が大腸菌 groEL や hdb3-1に感染しても同様の lump ができる<sup>(15)~(17)</sup>。この現象については次章で詳しく述べる。

遺伝子20と22欠損 T4 感染菌の場合はポリヘッドと呼ばれる円筒状の異常な頭部構造が蓄積する<sup>(11)</sup>。遺伝子20でできるポリヘッドは22のものと若干異なっている。20-ポリヘッドは内部に核構造 (core) を含み、幅は頭部と同じくらいであるが長さには制限が無いかのように細菌の幅いっぱいまで伸張している。このポリヘッドは感染後期に形成されるといわれている。22-ポリヘッドは20-と異なり core を含まず、幅が違うものがあり大きいものが小さいものを包み込んだ重層構造<sup>(18)</sup>をしている。

プロヘッドやファージの構造蛋白質の分析により、gp20 (遺伝子20の産物、蛋白質を意味する) は頭部と尾部の連結部にある構造である事が明らかにされコネクターと呼ばれるようになった<sup>(19)</sup>。コネクターは単に頭部と尾部の連結に働いているだけでなくプロヘッド形成に重要な役割をはたしている。またプロヘッドへの DNA 詰込みの際の入口になる事や、ファージの細菌への感染に際しては頭部からの DNA 放出の出口になる等ファージの生活環全体に渡ってキーポイント的な働きをしている。そのため DNA locating vertex あるいは portal

vertex と呼ばれる事もある。<sup>(20)</sup> その構造は図 4 に示すように 12 のサブユニットが 6 回対称形に配置したリング状で真ん中に DNA が通れるぐらいの穴があいて<sup>(21)</sup> いる。

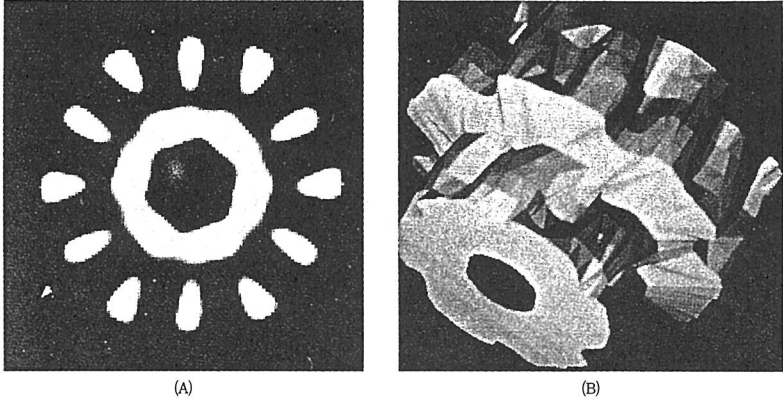


図 4 コネクターの構造、(A) 2 次元構造、(B) 3 次元構造<sup>(49)</sup>

gp22 が欠損するとポリヘッド内部の core 構造がなくなる事、プロヘッドに存在していた gp22 がファージになく、それと平行して core が消失している。これらの事実から gp22 は core を形成している構造蛋白質であると考えられ<sup>(23)</sup> た。

gp20 や gp22 がなくなるとポリヘッドになるということはプロヘッドの角(頂点)の形成にこれらの蛋白質が必要である事を示している。なぜなら頭部主要蛋白質である gp23 のみではポリヘッドになることが in vitro での再構成実験で示されており、in vivo の観察と一致している。<sup>(23/24)</sup>

遺伝子 21 と 24 が欠損するとプロヘッドの段階で頭部形成が止る事が知られている。21-プロヘッドと 24-プロヘッドは外見的にはほとんど変わらないが 21-プロヘッド内部の中心がぬけているように見える事からここに gp21 があるのではないかと考えられている。プロヘッドが頭部に成熟する時に構造蛋白質の切断

を伴うが、gp21 はこの切断するのに働く蛋白質分解酵素 (T4ppase) である事が示されている。<sup>(25)</sup>

gp24 はプロヘッドの12の頂点のうち基頂点を除いた11の頂点を構成していると言われている。<sup>(26)</sup> gp24 が欠損するとプロヘッドの段階で頭部形成が止まるが、遺伝子24の温度感受性突然変異体を用いた実験で高温で形成されたプロヘッドが低温に移されるとファージに成熟し、その時蛋白質の切断を伴う事が示された。<sup>(27)</sup>

以上の事実はプロヘッド構造蛋白質の切断が阻害されているとプロヘッドの以後の成熟が進まない事を示している。そして gp21 は切断するのに働き、gp24 は gp21 が働きを開始するためのきっかけとなる役割を持っているものと考えられる。

## 2) 宿主遺伝子の関与

T4 が大腸菌の突然変異体で groEL あるいは hdb3-1 と呼ばれる宿主に感染すると、頭部主要蛋白質 (gp23) が巨大な塊 (lump) となり頭部形成が初期の段階で阻害される事が分かった。T4 の遺伝子31が変異しても同じように lump ができる。

gp23 の働きについて近年盛んに研究が行われ、細菌だけでなく高等動物物においても似たような働きを持つ蛋白質が見つかった。それらを総称してシャペロン (介添え役) と呼ぶ。例えば高等植物においては、細胞質で合成された蛋白質が葉緑体に送り込まれる時葉緑体の膜を通過しなければならない。この通過をシャペロンが助けるのである。蛋白質が膜を通過するには特別な仕組が必要なのである。<sup>(28)</sup> このため膜の構造は膜の内外で正反対の性質を持っていて、膜の外側は親水性で内側は疎水性である。

T4 感染菌の場合 gp23 の影響を受けるのは頭部形成だけで尾部や尾部

繊維は正常に形成される。またラムダーファージでは頭部、T5 ファージでは尾部形成が阻害される。このような色々な影響を与え、しかも生物の違いによっても異なる結果をもたらすという事は gp23 の働きが直接的に頭部や尾部の形成に関わっているのではない事を示している。前にも述べたようにファージの頭部や尾部は各々独立に順序だって形成されている。頭部や尾部蛋白質の合成もタイムスケジュールに乗っ取って作られているが合成から形成までには時間経過がある。一般にファージ蛋白質は合成後膜にいったん結合する事が知られている。蛋白質が集合して一定の形を作る時、全ての蛋白質が混在している状態よりも必要な蛋白質が必要だけある方がよいと思われる。このようなわけでファージ蛋白質は合成後いったん膜に結合するものと思われる。特に gp23 のように大量の蛋白質が合成されると急激な集合が起り、lump のような巨大な塊を作るのではないと思われる。それを防ぐために gp23 を膜に結合させる働き (solubilize or carrying) をするものの存在が考えられた。<sup>(14)</sup>

T4 の場合、大腸菌の変異体で hdB3-1 という膜の脂肪酸合成に関する遺伝子の変異 (fatA) を持つ宿主に感染した時も groEL と同じ事が起る。また T4 遺伝子31が変異しても同じ結果を生む。遺伝子31の変異を持ちながら別の遺伝子に変異が起こった結果遺伝子31の変異をなんとか克服できるファージ (bypass31) が分離された。この bypass31 は遺伝子31の変異を持ったまま遺伝子23に変異が起っていた。しかもこのファージは groEL や hdB3-1 に感染して増殖する事ができる。<sup>(30)(31)</sup> すなわち T4 にとって遺伝子31の克服が宿主の遺伝子 groEL や fatA への依存を克服した事になる。また T4 プロヘッドはコネクターをアンカーにして膜に結合している事が知られている。これと関連して我々は興味ある実験結果を得た。表1に groEL と hdB3-1 に T4 が感染した時に新たに合成された gp20 が膜に結合するか否かを検討した結果を示す。<sup>(32)</sup> 野性株の大腸菌 B に T4 が感染した場合、gp20 は膜に結合している。ところが大腸



菌 groEL や hdB3-1 に感染した場合、gp20 は膜に結合していない。膜に結合している gp20 もコネクターの形になっているものと思われるが、膜に結合していない gp20 もすでにコネクターの構造をしている事が電子顕微鏡の観察によって確かめられている。

表 1 gp20 の膜への結合<sup>32)</sup>

T4 ファージ	宿 groEL	主 hdB3-1	B
10-18-22-23-	—	—	+
23-31-			+
23-			+

gp20（コネクター）が膜に結合している場合（+）、  
していない場合（-）で表した。

T431-が大腸菌に感染した場合、gp20 が膜に結合している。この結果は T4 が groEL、hdB3-1 に感染した時や、T431-が大腸菌 B に感染した時に gp23 が lump になるという同じ現象を生じる事実と大いに違っている。T4 gp31 は gp23 にのみ働くものと理解されるのに対して、gp groEL や hdB3-1 は少なくとも gp23 や gp20 の膜への結合に関与しているものと考えなければならない。

以上の事実は次のように考える事ができる。groEL や hdB3-1 に bypass31 が感染した場合ファージ蛋白質は膜に結合できなくてその結果 gp23 は lump になるはずであるが、gp23 に起った第 2 の変異のために gp23 の集合が遅くなり辛うじて lump にならずに頭部形成が進みプロヘッドが形成され感染ファージができたものと思われる。

この推論が正しいとすると gp groEL の役割はファージ蛋白質を膜に結合させるのに働いていると思われる。gp groEL の役割については酵素の形成 (folding) の際にそれを助けるシャペロン (shaperon、介添え役) として働いている事が示されている。例えば酵素が細胞質から葉緑体へ入る時などである。酵素が

膜を通過する前には球状のままでは通過できないのでいったん変性して、糸状 (defolding) にならなければならない。そして膜通過後はまた元の球状 (folding) の立体的構造をもたなければ酵素としての働きができない。この酵素の defolding-folding を助けて膜通過ができるようにしているのが gpgroE のシャペロンとしての働きである。同様に T4 感染菌において gpgroEL が欠損していると頭部主要蛋白質 gp23 が大きな塊 (lump) となる事、膜の脂肪酸合成に関する遺伝子である fatA 欠損 (hdB3-1) 感染菌においても同様な lump が形成される事を考え合わせると gp23 の頭殻への集合が巧くいくためには gp23 の膜への結合が不可欠である事を示しているように思われる。

T4 の遺伝子31が欠損していると、同じく gp23 の lump を作るという表現形を表す。頭部主要蛋白質である gp23 が lump になると以後の頭部形成は進まなくなる。gp23 の膜への結合は頭部形成の非常に初期の段階である事を示している。そしてこれには gpgroEL と gp31 が関与しており、hdB3-1 のように膜に異常があると gp23 の膜への結合が阻害され gp23 の急激な集合が起った結果 lump ができるものと理解する事ができる。

Huang (1975) は T4 感染菌において合成された T4 蛋白質の全てが膜に結合する事を示している。<sup>(33)</sup> groEL や hdB3-1 の影響を受けるのは gp23 のみ (他の頭部蛋白質も小さな lump を作るという人もいる。) で尾部や尾部繊維は正常に形成される。また T5 ファージでは尾部形成が阻害されたり、ラムダファージでは頭部というように阻害のされかたが異なっている。T3 は何の影響も受けない。これらの事実を考えると gpgroEL が直接的に gp23 に関わって gp23 の集合を助けるというよりは gp23 を含めて T4 蛋白質の全てを膜に結合するのに関わっていると考えた方が良いように思われる。このような考え方は他でも示されている。<sup>(17)(33)</sup>

gpgroEL はストレス蛋白質の一つであるヒートショック蛋白質で熱などの

ストレスがかかると大量に合成される。その働きは細胞内の蛋白質を変性して膜に結合させる、あるいは膜を通過するのを助ける。また膜通過後の蛋白質の再形成 (refolding) を助けるものであるとされている。

ファージ感染の場合には同じように細胞に感染によるストレスがかかりファージ蛋白質の膜への結合を促進するのではないと思われる。ファージは細菌のこの応急処置を巧く自分たちの増殖に利用していると考え事ができる。この gpgroEL が欠損していたり、膜の状態がおかしくなっていると (fatA のように) ファージ蛋白質は膜に結合できなくなる。gp23 は特に gpgroEL、gp31 の助けを借りて膜に結合するものと考えられる。gp23 が膜に結合できないと lump になる。bypass23 は遺伝子31の変異により膜に結合できなくても遺伝子23に起きた変異により lump にならずに頭部形成が進行する。ゆえに bypass31 は遺伝子31だけでなく大腸菌 groEL や hdB3-1 等の宿主の変異をも同時に克服する事ができるようになったと考える事ができる。

### 3) プロヘッド

二十面体の蛋白質の外殻の中に DNA を含む頭部の形成については次の三つのモデルが考えられた。1) 外殻がまずできて、その中に DNA が入る。2) DNA が縮合して外殻の核となりその周りに蛋白質が集合して頭部ができる。

3) DNA と蛋白質が相互作用しながら DNA の周りに頭部ができる。Matsuo-Kato and Fujisawa (1973) は T3 ファージにおいて、成熟した頭部の頭殻とは形、大きさが少し異なる頭部前駆体 (プロヘッド) に DNA が詰込まれて頭部が完成する事を示した。その後色々なファージやウイルスで 1) のモデルが正しいとされた。<sup>(34)</sup>

T4 ファージでは、Simon (1972) が T4 感染菌の超薄切片の電子顕微鏡による観察によって細胞膜上にあるタウ粒子 (tau particle、プロヘッド) が細胞膜

を離れて空頭 (empty head) になり次いで DNA の詰った頭部になる事を示した。この結果はタウ粒子が頭部前駆体である事を示唆<sup>(35)</sup>している。

T4 の遺伝子21と24が欠損した場合タウ粒子がたまる。そこでこれらの遺伝子の温度感受性突然変異体 (ts mutant) を高温で感染した時にできるタウ粒子が低温にした時に DNA の詰まったファージに変換するかどうか調べられた。ts24 感染菌の蛋白質を高温でパルス標識し、温度を下げて追跡する実験により、ts24 のタウ粒子はファージに変換する事が分かった<sup>(36)</sup>。ts21 のタウ粒子では gp21 が温度可逆性をもたず、タウ粒子のファージへの変換は起らなかった。これらの結果から、成熟頭部に較べて少し丸みを帯び、大きさも少し小さな粒子が頭部前駆体 (プロヘッド) である事が明らかになった。

表2 プロヘッドとファージの構成蛋白質<sup>(37)</sup>

遺伝子産物	プロヘッド		成熟頭部	
	分子量(x 10 <sup>3</sup> )	コピー数	分子量(x 10 <sup>3</sup> )	コピー数
gpalt(B1)	75	42	67	43
gp20	65	30	65	15
gp23	56	1000	48.7	1000
gp24	48.4	70	46	65
gp22	29.8	600	2.5	120
gp21	27.5	50-100	18.5	1-4
IPIII	23.5	370	21	400
gp68	17	200-300		0
gp67	9.1	330-380	3.9	140
IPI, IPII	10, 11.7	750	8.9, 10	200-400
hoc		0	39.1	100-150
soc		0	9.7	1000

その後プロヘッドが精製されその蛋白組成が明らかになった。表2に色々な構造の蛋白組成を示す。プロヘッドは11蛋白質から成りその内の7つ (gp20, 21, 22, 23, 24, 67, 68) がファージ増殖に必須で、残りの4つ (IPI, IPII, 22

IPIII, alt)は無くてもよい。プロヘッドと完成したファージ頭部の蛋白組成が較べられた。表2に示すようにプロヘッド蛋白質とファージ蛋白質は変化している。ファージでは gp21, gp22, gp67, gp68 と IPI, IPII, IPIII は消失し、gp23 と gp24 の分子量は小さくなり、gp20 の量は半減している。

外部形態もプロヘッドは頭部に較べて丸みを帯び、大きさも少し小さめである(図5)。すなわちプロヘッドに DNA が入って頭部になると、頭部外殻蛋白質の gp 23, 24 が一部切断され頭殻構造が変化するという一連の大きな変化が起る事を示している。またプロヘッドと DNA のぬけた頭部を較べるとプロヘッドの内部には核構造(core)と呼ばれる構造が見える。頭部にはないので core の消失と gp21, gp22, gp67, gp68, IPI, IPII, IPIII の消失が対応している事が分かる。

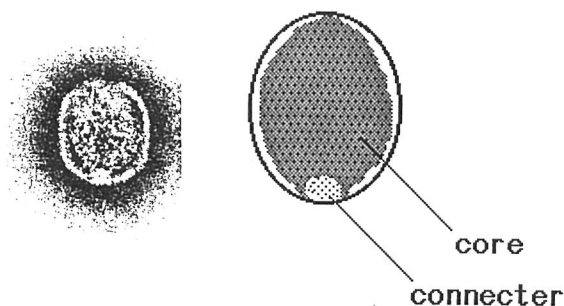


図5 プロヘッドの構造

これらのプロヘッド蛋白質の役割や、存在箇所はかなり分かっている。gp23 と gp20, gp24 はプロヘッドの外殻を形成し、その内 gp23 は頭部主要蛋白質である。gp20 と gp24 はマイナーな蛋白質で、gp20 はプロヘッドの12の頂点の1つで基頂点と呼ばれる頭部と尾部のつなぎ目(コネクター)に位置している。gp20 の役割はそのプロヘッド上の位置や、遺伝子20欠損の場合にプロヘッドを形成できず頂点のない長い筒上の頭部(ポリヘッド)に成る事から、プロヘ

ッド形成の開始と頂点形成に関係していると考えられる。gp24 は残りの11の頂点を占めていると言われている。

他の蛋白質はプロヘッド内部に存在する core を構成している。その内 gp21 はプロヘッド蛋白質を切断する蛋白分解酵素で T4ppase と呼ばれている。プロヘッドが頭部に変換するとき gp23, gp24 は gp21 に切断されて小さくなり、core 蛋白質は IPI, IPII, IPIII が小さくなって頭部内部蛋白質として残るが他の蛋白質は完全に除去される。また ts24 感染菌の高温では切断が起らず、温度を下げると切断が起る。すなわち高温でプロヘッドがたまり、温度を下げると蛋白質の切断に伴って頭部構造変換が起りファージに成熟した事を示している。この事実は T4ppase が働くようになるには gp24 が必要である、あるいは gp24 が T4ppase の引き金役をしている事を示している。

#### 4) プロヘッド形成の開始

遺伝子20、22、40欠損 T4 感染菌において、プロヘッドが形成されずにポリヘッドができるということはプロヘッド形成の開始にこれらの遺伝子が必要である事を示している。

gp20 はプロヘッドの基頂点にあり、細菌の膜への結合点でもある。また core 構造とも結合している事から最も基本的なプロヘッド形成の開始に必要であろうと思われる。gp20 は12個集ってコネクターというリング状の構造を作る。それで図4に示すように6回対称形をしている。プロヘッドは20面体<sup>(21)</sup>なので20の面と12の頂点をもつが、20面体の頂点は幾何学的に5回対称形になっている(図9)はずなのにプロヘッドの基頂点は6回対称形である。5つの面が接する頂点に6回対称形のコネクターが配置していると言う事はプロヘッド形成の開始とおおいに関係がある。コネクターに結合するネック構造及び尾部は6回対称性を持っているのでこの対称性の不一致はおもしろい問題である。尾部の場合

は6回対称形の面と面が接するのに対して、プロヘッドの場合は5つの面の頂点と6回対称形のコネクターの関係であると言う違いがある。頭部の5回対称性に対して尾部の6回対称性というこの対称性の不一致をコネクターの構造によって巧く回避しているのかもしれない。この事実に対して、gp 24は5量体<sup>(37)</sup>で5回対称性を持ちプロヘッドの基頂点以外の頂点を占めている。それにもかかわらず gp24 はプロヘッドの開始にも頂点形成にも関係しない。コネクターが基頂点以外の頂点形成にも深く関係している事を示唆しているように思われる。

遺伝子22が欠損すると core 構造を欠いたポリヘッドがたまる。このポリヘッドは20-ポリヘッドと異なり幅がプロヘッドより大きな物ができる。またポリヘッドの周りに何重にもポリヘッドが取り巻いて多重構造になったものもできる。<sup>(23)</sup>この事実は頭部外殻蛋白質 (gp23) には蛋白構造の周りを取り巻く性質がある事を示唆する。すなわちプロヘッド形成の際には core 構造の周りに gp23 が集合してプロヘッドを形成するのではないかと考えられる。また同時に gp23 には一定の形、大きさを決める能力のない事を示している。

以上の事実から、gp20 と gp22 が共同してプロヘッド core を形成し、その周りを gp23 が取り囲む事によりプロヘッドができると仮定する事ができる。すなわち core 構造がプロヘッドの形（幅、長さ）を決定しているものと思われる。この仮定はプロヘッドの外殻形成に先立って core 構造が形成されなければならない事を示している。

Traub and Maeder (1984) は core 構造の形成を調べるために遺伝子23が欠損している T4 ファージ感染菌や、gp23 を lump にしてしまう宿主 hdB3-1 を用いてその生成物を調べた。core 構造が非常に不安定であるために検出するのは困難であったが、彼等は構造を固定する方法を工夫し感染菌の超薄切片で膜に結合している core を観察する事ができた（裸の core、naked core）。その構造はラグビーボールのように楕円形でスポンジのような外見をしている事が

分かった。プロヘッド内の core 構造と較べてみると大きさや形、外見の感じなどがよく似ている。この naked core の形が少し縦長になっているということはすでに core 構造がまず形成され、この構造の周りに gp23 が集合してプロヘッドが形成されると言う先の仮定を支持している。<sup>(38)</sup>

しかし彼等の実験では20<sup>-</sup>感染菌でも naked core が形成されると言う事が大きな矛盾点である。後に Kuhn et al (1987) はこの20<sup>-</sup>ファージを hdB3-1 に感染して得られた naked core に gp20, gp23, gp24 を加えてプロヘッド形成があるかどうかを確かめたところ、部分的に gp23 が naked core の周りを覆う形になったが完全なプロヘッドの形成は認められなかった。彼等の結論は core 形成には gp20 は必要ではなく、プロヘッドの外殻の形成に必要であると言う事である。<sup>(39)</sup>しかしこの結論は後で述べるように多くの実験事実と矛盾するだけでなく、完全なプロヘッドの形成ができないと言う点は非常に説得力に欠けるものである。また同じ感染菌で彼等は naked core に尾部が結合しているのを報告している。尾部は gp20 からなるコネクターに結合する事が知られているので、まさにこの事実は gp20 が naked core に結合している事を物語っていると思われる。彼等の用いたファージの遺伝子20の欠損箇所がC端近くでほんの少しの欠如しか gp20 に与えず、naked core の形成がなんとか出来たのか<sup>(22)</sup>もしれない。

## 5) in vitro ポリヘッド形成

感染菌からの観察だけではプロヘッドの形成過程を知るには限界がある。プロヘッド形成に関係する蛋白質だけを取り出して各々の性質、役割を決めていかなければなかなか明らかにならない。そのためには蛋白質を精製し、再構成できる系を作る事が必要である。

van Driel (1977) は T4 の遺伝子20と22のアンバー感染菌からそれぞれポリ



ヘッドを抽出して、低濃度の塩溶液におく事によりポリヘッドを個々の蛋白質にばらばらにした。これらの蛋白混合液を超遠心して細胞膜等の不純物を除くと、22<sup>-</sup>ポリヘッド蛋白混合液はほとんど gp23 のみになり、20<sup>-</sup>ポリヘッド蛋白混合液は gp23, gp22, IPI, IPII, IPIII が含まれていた。この蛋白混合液では、gp23 は6量体、他の蛋白質は1量体になっていた。<sup>(23)(37)</sup>

これらの蛋白混合液を用いてポリヘッドの再構成実験を行ったところ表3に示すように22<sup>-</sup>混合液(gp23)では両端の開いた多重に重なったポリヘッドが形成され、20<sup>-</sup>混合液(gp23, core 蛋白質)は一様な幅の core を含んだポリヘッドが形成された。core のみの構造は見つからなかった事から、彼は core 構造が gp23 に取り巻かれていないと非常に不安定であると推論している。

この in vitro 再構成実験の結果は、遺伝子22欠損感染菌では core の無いポリヘッドが出来、20欠損感染菌では core を含むポリヘッドが出来るという in vivo での観察と全く同じであるということを示している。以上の事実から、gp23 は自己集合して筒状のポリヘッドに成ることが出来るが、プロヘッドには成れない事が分かる。また gp 23には大きさを決める能力がない事も分かる。

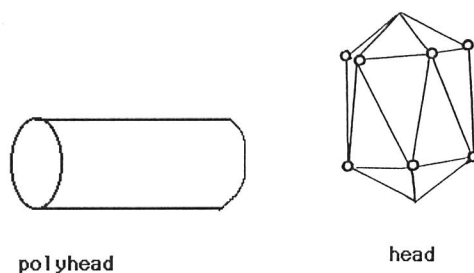


図 6 ポリヘッドと頭部の構造

プロヘッドとポリヘッドの構造の違いは図6に示すようにプロヘッドには角(頂点)があるという事である。すなわち gp23 は6量体の単位構造となり、これらは並んで平面を作る事が出来るが頂点を作る事は出来ないと言う事であ

る。ポリヘッドは円筒状なので平面が丸まったものと理解される。頭部を作るためには頂点が出来なければならない。gp23 には大きさを決めたり、頂点を作ったりする事が出来ないと言う事はプロヘッドの形を決めているのは core である事を物語っている。そしてこの core の形成には gp20 と gp22 が必須の役割をしているものと思われる。

#### 6) in vitro プロヘッド形成

van Driel and Couture (1978) はプロヘッドを低温、低濃度の塩溶液中における事によりプロヘッドを個々の蛋白質に分解し、それをプロヘッドに再構成する事に成功した。<sup>(40)</sup> 再構成されたプロヘッドは形、大きさ、蛋白組成等が元のプロヘッドと変らなかった。この事実はプロヘッド構成蛋白質だけでプロヘッドが形成できるという事を示している。in vivo では gp31 と宿主蛋白質の gp280EL を要求するが、in vitro では必要でないという事を示唆している。

彼等の実験結果を見るとかなりの数のポリヘッドも同時に形成されている。しかもこれらのポリヘッドは片方、あるいは両方がプロヘッドのように閉じた構造になっていたり、折れ曲がったりしている。このようなポリヘッドが出来ると言う事はプロヘッドの初期形成は起ったがすなわち6つの頂点を作ったが、プロヘッドのように12の頂点を作れなくてそのまま gp23 の集合が続いてポリヘッドのように成ったものと思われる。このようになる原因は頂点形成に関与している蛋白質の不足ではないかと考えられる。

gp20 は非常に gp20 どうしで集合しやすく、また試験官の管壁に付着したりして溶液からすぐに見失われてしまう。プロヘッドの基頂点は gp20 であるという事実と考え合わせると他の頂点形成にも gp20 が関わっている事を示唆しているようである。

プロヘッドが再構成されたと言う事はプロヘッド形成に先立つ core が in

vitro で形成された事を示している。彼等は core 形成に関与する蛋白質を特定するためにプロヘッドの液解蛋白混合液をゲルろ過して幾つかの分画に分け、core 蛋白質 (gp22, IPI, IPII, IPIII) に各分画を加えて core 形成があるかどうかを検討した。形成された構造はプロヘッドの内部にある core の構造と大きさ、形がよく似ており gp 23が無くても core 形成がある事が確かめられた。また core 形成能が一番大きな蛋白質が含まれている分画 (void fraction) にあった。この分画の蛋白組成が調べられ、core 形成に必要な蛋白質は gp20<sup>(41)</sup> であるという可能性が示唆された。

この実験では gp20 を含む分画に core 蛋白質がたくさん含まれていたために結果が明確でなかった。もっと問題が残ったのは、この実験に用いられたセファデックス 6B カラムの void fraction はおよそ200万以上の分子量の蛋白質が出てくるところであるのに対して gp20 からなるコネクターの分子量は78万で、コネクターがこの分画に出てくるのは納得のいかない事である。多くの core 蛋白質を含んでいると言う事とあいまって、分解しきれなかった core が出てきたのではないかという可能性を残してしまった。このようなあいまいさが残る原因はコネクターが非常に集合しやすく、すぐに塊になってその活性を失ってしまうからである。

## 7) in vitro ポリコア (polycore) 形成

Caldentey ら (1987) は core 蛋白質を個々に精製し、遺伝子20をクローニングした菌から精製した gp20 を使って core 形成を試みたが、gp20 の持つすぐに集合してしまう性質のためにその活性を見る事が出来なかった。しかし core 蛋白質だけで再構成実験をしたところポリコア (多くの core という意味) が出来た。gp 23を加えるとポリヘッドが形成されるので、これはポリヘッドの中にある core 構造と思われる。ポリヘッド内の core と同様に幅は一定であ

るが長さは一定ではなかった。この形成には全ての core 蛋白質が必要で、蛋白精製後すぐに実験に用いないとポリコア形成が出来ないと言う事が分かった。core 蛋白質に gp23 を加えるとポリヘッドが出来るのでポリヘッドの場合も core 形成がポリヘッド形成に先行している事が確かめられた。<sup>(42)</sup>

#### 8) gp 20複合体の分離

プロヘッドや core の再構成実験を確実にに行い、そしてその後の解析をするためにはどうしても活性のある gp20 が必要である。今までプロヘッドとクローニングした菌から gp20 の分離をしてその活性を調べたが余り成功しなかった。そこで私は T4 感染菌から活性のあるコネクターの分離を試みる事にした。<sup>(43)</sup>

Kochan and Murialdo (1983) がラムダファージ感染菌においてコネクターが gpgroEL と結合していると言う見解をだした。<sup>(44)</sup> Dürrenberger は gpgroEL がラムダファージでも頭部形成に關与している事、及び gpgroEL の14量体を作る構造がコネクターの構造と形や大きさがよく似ている事をヒントに T4 でも gpgroEL とコネクターが結合しているのではないかと言う仮説を考えた。もしそうなら、gpgroEL とコネクターの複合体を分離できればプロヘッドや core の再構成の開始の活性を持つのではないだろうかと言う提案をした。彼の仮説ではこの複合体はバクテリアの膜のところへ行ってそこでコネクターを膜に結合させる。そこでもし膜に異常があればこの複合体は膜に結合できないはずである。そして hdB3-1 (fatA) というバクテリアの突然変異体でこの菌に T4 が感染すると groEL と同じように lump が出来る事から、この複合体が膜に行くと fatA の遺伝子産物が働いてコネクターを膜に結合させると仮定した。すなわち彼の提案は hdB3-1 に T4 を感染してこの gpgroEL ~ コネクター複合体を分離すればよいというものであった。

そこで私は hdB3-1 に 10<sup>-</sup>, 18<sup>-</sup>, 22<sup>-</sup>, 23<sup>-</sup> T4 を感染し、そこから gpgroEL

～コネクター複合体を分離する事を試みた。用いた T4 はなるべく尾部や頭部が出来ない方が精製しやすいので多数の遺伝子欠損を持つものを選んだ。

感染溶菌液をまず硫酸沈殿で落とし、セファデックス 6B で分画すると void fraction に gp 20が見つかった。それをさらにグリセロール密度勾配遠心法で精製した。精製の過程で gp groEL ～コネクター複合体は見つからず、コネクターと gp groEL は別々に精製された。

精製されたコネクターは gp20 の他に 2つの蛋白質と結合している事が分かった。それでこの構造を gp20 複合体と呼ぶ事にする。図 1 に示されている T4 ファージの首の部分にある 6本の繊維状の物はウイスキー(wac)と呼ばれているが、これが精製されたコネクターに結合している事が分かった。ウイスキーはファージのコネクターに結合しているのであるが、ファージの形態形成の過程では頭部形成の最終の段階(頭部に DNAが入って頭部が完成した段階)で結合すると言われている(図3)。頭部形成の開始に必要なコネクターにウイスキーが結合しているというのは驚きであったが、その後の再構成実験ではこのウイスキーが目印の役をして解析に役立った。なぜコネクターにウイスキーが結合しているのかと言う事について考えられる理由は、精製のためにコネクターをフリーの状態であく細胞中に置いたためではないかと思われる。キャ  
(45/46)  
プシッドにウイスキーや尾部が結合している事があるのが観察されているので、頭部の完成がウイスキーの結合の条件でない事が分かる。このウイスキーはフ  
(47)  
ァージの生存にはなくてもよいものなのでプロヘッド形成の開始には余り役に立っていないと思われる。しかしコネクター精製には重要でこれが無ければ今までと同様にすぐに集合してしまっ精製できなかったと思われる。

## 9) gp20 複合体による in vitro プロヘッド形成

ts21 感染菌から抽出したプロヘッドを低温、低濃度の塩溶液に置いておくと

プロヘッドがつぶれて個々の蛋白質混合液になる。この蛋白質混合液に gp20 複合体を混ぜて室温で一晩置くとプロヘッドが再構成された。再構成されたプロヘッドは各頂点にウイスキーらしい物が見え、この結果からプロヘッドの頂点は基頂点だけでなく全ての頂点が gp20 から構成されているのではないかと考えられた。

現在一般に受入れられている考えではプロヘッドの基頂点は gp20 で、他の頂点は gp24 である。ではなぜこのように考えられるようになったのであろうか。

Müller-Salamin ら (1977) はキャプシッドの頂点を化学的な方法で特異的に壊す方法により基頂点は gp20 より成り、他の頂点は gp24 から成っている事を結論した。またさらにプロヘッドに抗 gp24 血清を作用させて抗体がプロヘッドの多くの頂点に結合すると言う結果から、gp24 がプロヘッドやキャプシッドの基頂点以外の頂点を占めている事を結論した。<sup>(26)</sup>

Dridonks らは ts21 感染菌からプロヘッドを分離し、プロヘッドから gp20 を精製した。精製された gp20 は精製途中で変成されたので、最後に再構成がなされた。その構造は図 4 に示すように 12 の gp20 がリング状に配置し、真ん中に穴のあいている構造をしていた。<sup>(21)</sup>

Dridonks and Caldentey (1985) は Salamin らの実験結果を確かめるために、抗 gp20 血清を用いて頭部関連構造体について gp 20 の配置を検討した。<sup>(48)</sup> プロヘッド、キャプシッド、頭部の取れた尾部（裸の尾部；コネクターを尾部につけたまま頭部を外したもの）、ポリヘッド等の構造体に抗 gp20 血清を作用させて抗体がこれらの構造のどの部位に結合しているかを見た。抗体に金の小さな粒子を付けておくと抗体の付いているところが分かる。この実験では抗体と構造体を混ぜて反応させたので、構造体がもし多くの箇所に抗原を持っているとそこで抗原抗体反応が起り、これらの構造体は集合して沈殿を作る（図

7)。彼等是用いた抗血清が gp20 に特異的に反応する事を示すために抗 gp20 血清と精製したコネクターを混ぜてコネクターが集合する事を見ている。

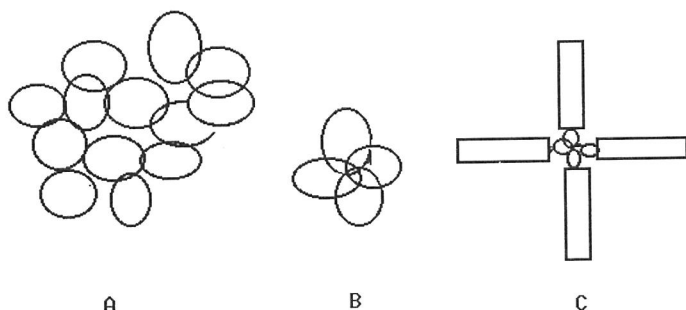


図7 抗 gp20 血清と構造体との反応

- (A) もしプロヘッドが12の頂点全てに gp20 を持っているとする抗 gp20 血清との結合で大きな集合体を作る。  
 (B) もしプロヘッドが基頂点にだけ gp20 を持っているとする基頂点を中心にして車状に集合する。  
 (C) 尾部の頭部側に結合している gp20 を中心にして車状に集合している。

彼等の実験結果をまとめると次のようである。

i) プロヘッド、キャプシッド、裸の尾部は抗体と反応して液が濁る（集合した事を示す）。プロヘッドは特に濁りが大きいのにに対してポリヘッドの濁りは小さい。

ii) 電子顕微鏡で i) を見るとプロヘッドは大きな集合体を作っており集合体の中に金粒子が見える。キャプシッドは集合体を余り作っていないし、金粒子も少ない。尾部は頭部側の部分で車状に集合し、その集合しているところに金粒子が見える。

彼等の実験ではプロヘッドが大きな集合体を作ったにもかかわらず、この結果についての解釈をせずに、集合していないプロヘッドあるいは小さな集合を作っているプロヘッドについて金粒子がプロヘッドの基頂点にのみある（gp20 は基頂点のみに存在している）と言う間違った結論をしているのである。

この結果は次のように解釈すべきである。

i) プロヘッドが抗体と反応して大きな集合体を作ったと言う事はプロヘッドの基頂点以外の頂点も gp20 である事を示している (図 7 A)

ii) 集合していない、あるいは小さな集合を作っているプロヘッドは頂点から gp20 を失ったので集合していないのかもしれないので基頂点以外に gp20 が無くても当然と考えられる。いずれにせよ大部分のプロヘッドを無視して、一部分のプロヘッドについての結果から結論をだすのは間違っている。

iii) プロヘッドに較べてキャプシッドでは抗体に対する反応が弱くなっているのは、彼等の説明ではプロヘッドからキャプシッドに構造変換したためにコネクターの抗体と反応する部位が頭部の中に隠れてしまったためであるとしている。しかしこれはキャプシッドではコネクターがプロヘッドに較べて減った結果である (すなわち基頂点以外のコネクターがキャプシッドからなくなった) と解釈する事が出来る。

iv) 頭部と尾部の連結部に gp20 がある。抗 gp20 抗体により数個の尾部が車状にこの連結部を中心にして集まっている結果が示されている。この結果はまさに彼等が言うように連結部にコネクターがある事を示している (図 7)。

以上に述べた点から、彼等の結論と異なるところはプロヘッドの頂点は全て gp20 と考えられると言う事である。基頂点が gp20 であるという事はこれらの実験で確かめられたが、彼等の結論はファージやキャプシッドと同様にプロヘッドも基頂点だけが gp20 であると結論したところに疑問を呈しているのである。

そこでこの考えを確かめるために Driedonks ら (1983) の実験方法ではプロヘッドが集合してしまうので、まずプロヘッドをメッシュに固定してから抗 gp20 血清で反応させる事にした。抗体には 金粒子が目印につけてある。結果は予想どおりにプロヘッドの基頂点だけでなくあらゆる頂点に金粒子が付き得



(49/50)  
る事を示した。

以上の結果をまとめると、プロヘッドの頂点は基頂点だけでなく全ての頂点がコネクターによって占められていると言う事である。

この結論はどのように考えられるだろうか。

今までは基頂点だけが gp20 と考えられていたので基頂点が開始点になって、そこからプロヘッドが作られると考えられていた。しかしファージ頭部のように対称な構造をしているものが作られる方法は対称体（プロヘッド）が作られてから、非対称に部分的に作り替えられる方が自然ではないかと思われる。

#### 10) gp20 複合体による in vitro での core 形成

in vitro でのプロヘッド形成においては core 形成が先行し、core の形や大きさがプロヘッドの形を決めている。core 蛋白質の再構成実験で polycore が形成され、gp23 を加えるとポリヘッドが出来ることが示された。これは in vitro でも core の形に従って頭部が出来ることが示している。またプロヘッド蛋白質混合液に gp20 複合体を加えるとプロヘッドが再構成されるという事は、core 蛋白質に gp20 複合体を加えると core が出来るはずである。

実験の結果、予想どおり polycore の代わりに core が形成された。形成された core は5回対称性を持っており20面体構造の特徴を供えていた。そしてその端に繊維状の構造が見え、これは gp20 複合体のウイスキーであると考えられる。この観察から、図8（F）に示すような core の構造が推定された。再構成されたプロヘッドの12の頂点には gp20 複合体が結合している事が推定されたが、同じく再構成された core の12の頂点にも gp20 複合体が結合していると推定される結果を得た。これはまさしく core の周りにコネクターを起点にして gp23 が集合してプロヘッドが作られる事を示している。

表3に今までに得られている in vitro 再構成実験の結果をまとめてある。

表 3 プロヘッド構成蛋白質の再構成

プロヘッド構成蛋白質	再構成構造
gp23	core 無しポリヘッド <sup>(33)</sup>
gp23 + core 蛋白質	core 含有ポリヘッド <sup>(33)</sup>
gp22	リボン状構造 <sup>(67)</sup>
core 蛋白質	polycor e <sup>(42)</sup>
core 蛋白質 + gp20 複合体	core <sup>(33)</sup>
gp23 + core 蛋白質 + gp20 複合体	プロヘッド <sup>(33)</sup>
プロヘッド蛋白質*	core 含有ポリヘッド、少量のプロヘッド <sup>(33)</sup>
プロヘッド蛋白質 + gp20 複合体	プロヘッド <sup>(33)</sup>

core 蛋白質 (gp22, 68, 67, IPI, IPII, IPIII)

プロヘッド蛋白質 (gp23, 24, 20, + core 蛋白質)

\*プロヘッド蛋白質のみでプロヘッドが多量に再構成される事が報告されている。<sup>(40)</sup>

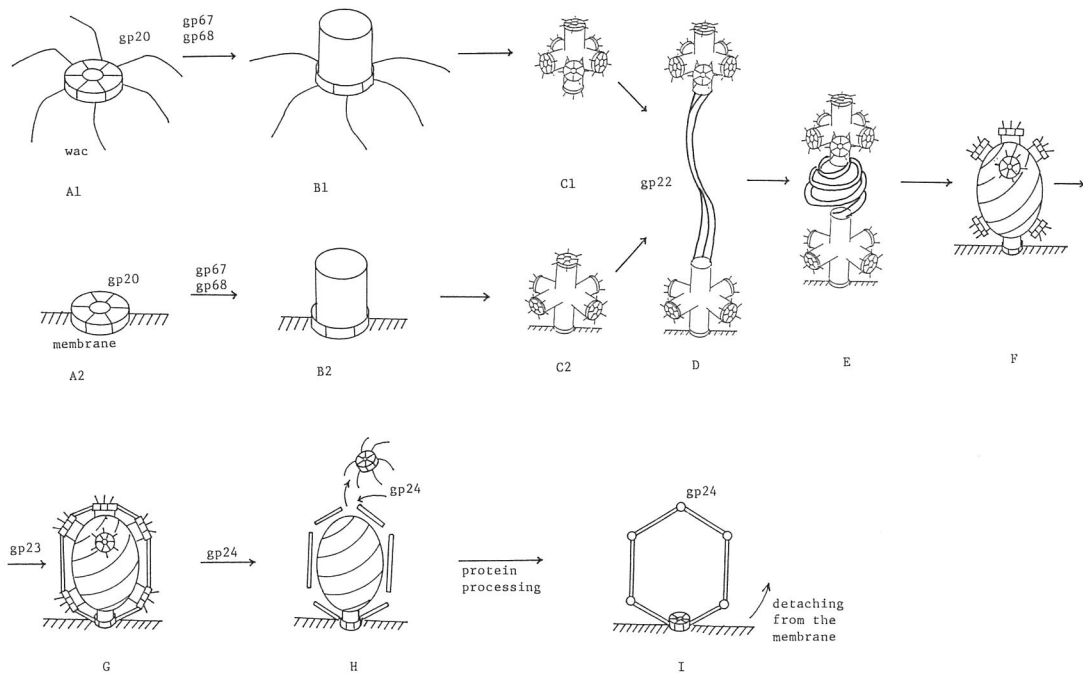
#### 11) プロヘッド形成過程のモデル

van Driel (1980) は精製した gp22 がリボン状の構造に再構成される事を見つけた。<sup>(37)</sup> この結果と in vitro で再構成された core の観察結果から Engel ら<sup>(41)</sup> (1982) はコネクターを起点にして 6 本の gp22 のリボン構造が螺旋状に巻いたラグビーボールのような構造のモデルを提唱した。<sup>(51)</sup> このモデルは確かに彼等が再構成した core によく似た構造をしている。しかしこのモデルでは gp22 のリボンの長さで頭部の形が決まってしまうので頭部コート蛋白質である gp23 や gp24 の変異で長いものや短くなった頭部が出来る事を説明できない。

gp20 複合体を使って再構成されたプロヘッド及び core の実験結果から推定されるプロヘッド形成過程のモデルを図 8 に示す。

(A 2) まず基頂点となるコネクターが膜に結合する。これには gp20EL が関与している。gp20EL のシャペロンとしての働きがコネクターの膜への結合に働いているものと思われる。もし膜の状態が悪い (hdB3-1 の場合) 時には膜に結合できない。その場合コネクターはフリーの状態になる。この場合遺伝子

図 8 CORE とプロヘッドの構造形成過程のモデル <sup>(32)</sup>



23の変異のために gp23 が膜に結合できなくても lump にならなければ、フリーのコネクターを使ってプロヘッドは形成される (bypass31)。in vitro では蛋白濃度、塩濃度が比較的低いので gp23 の助けがなくても (すなわち gp23 が膜に結合していなくても) プロヘッド形成は出来ると考えられる。

(B) コネクターを開始点として core 蛋白質の gp67, gp68 が集合し core の腕を作る。core の腕が gp67, gp68 で構成されていると言う直接的な証拠はない。

(C) 6本の腕が集まって星型構造を作る。

(D) ~ (F) 2個の星型構造が gp22 のリボン構造を介してつながり core ができる。ポリコアの再集合実験で示唆されたように (E) から (F) に移る時に IPI ~ IPIII が core の周りを埋めて補強するのではないかと考えられる<sup>(42)</sup>。

(G) core の周りに gp23 が集合してプロヘッドが出来る。

ここまでのプロヘッドの形成される過程であるが、プロヘッドが完成するとキャプシッド、ファージへと変化して行く。

(H) gp24 が gp20 に作用して基頂点以外の gp20 が gp24 にとって代わる。これがきっかけとなり、gp21 (T4ppase) が働いて gp23, gp24 の切断、及び gp22, gp67, gp68, IPI, IPII, IPIII の切断、排出が起る。

(I) プロヘッドは膜から離れ、細胞内に移動する。すなわちプロヘッドからキャプシッドへの構造変換が起る。

キャプシッドの基頂点から DNA が頭内部に進入する (DNA パッケージング)。

頭部に尾部が結合する。

尾部に尾部繊維が結合してファージが完成する。

## 12) プロヘッドの形の決定

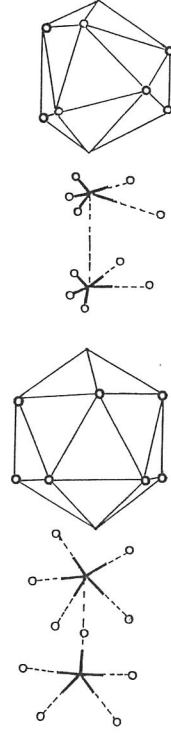
T4 ファージの頭部は正二十面体ではなく少し縦長になっているので、どのような機作で形や長さが決められているのかがいつも問題になっていた。なぜなら後に述べるように T4 の DNA パッケージングは頭部いっぱいの DNA が詰め込まれると DNA の切断が起ると言う機作になっているので頭部の大きさが一定に決まっている事は T4 にとっては死活問題である。実際正二十面体の頭部や 5 倍くらい長くなった頭部が発見されており、それらの持つ DNA の長さを較べてみると頭部の大きさに従って短くなったり、長くなったりしている。そこで頭部の形、大きさがどの様にして決まっているのかを考えるために、なぜ色々な形、大きさを持つ頭部が出来てくるのかという観点から述べてみたいと思う。

図 9 に長さや形の決定についてのモデルを示す。

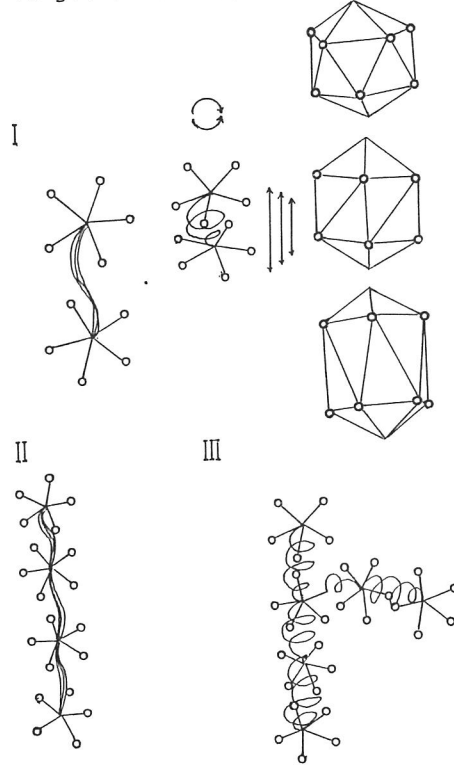
T4 ファージ頭部の構造は縦長の二十面体である。この立体構造は 11本の軸を持っている。図 9 で明らかなように、これらの軸は正五角形の中心から頂点に伸びる 5 本が 2 組と縦に 1 本からなっている。2 組の 5 本の軸は同一平面にあり、互いに 36 度ずつずれている。各軸の頂点（すなわち 20 面体の頂点）は○印で示している。20 面体の 12 の頂点において 5 つの面が接している事が分かる。すなわち頂点は 5 回対称性をしている。

このモデルはこれらの軸構造が core の骨格であるという考えに基づいている。core の基本的な構造は 2 組の星型構造とこれらの星型構造を結びつける gp 22 のリボン状構造である（図 8 D）という考えを図 9 では軸構造で示している。そして軸構造の端にある○印はコネクターを示す。すなわち core に存在するコネクターがプロヘッドの頂点になり、図に示されている頭部構造はプロヘッドではないが頭部に変換されると基頂点以外のコネクターが gp 24 と入れ替わるという対応関係を示すために便宜上同じ○印で示している。図 9 の I, II, III, に示している軸は図を簡略にするために頭部の基調点とそれと対称の

form determination



length determination



axes of head

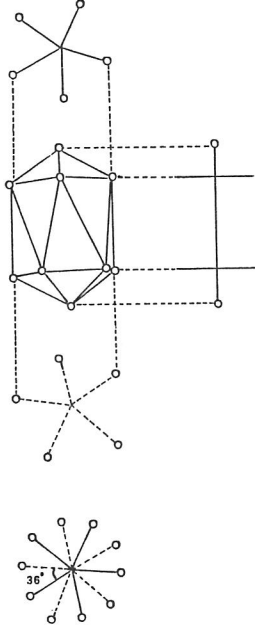


図 9 頭部の長さ、形の core による決定<sup>(32)</sup>

位置に在る頂点から伸びる 2 つの軸を省略している。

(a) 頭部の長さの決定

T4 ファージには長さの異なる頭部が発見されている。それらは遺伝子23及び24の変異によっている。遺伝的な変異の他に薬剤の投与によって頭部の長いジャイアントファージが誘発される事が報告されている。遺伝子23の変異(pt)の感染菌では正二十面体(small head)、正常頭部(prolate head)と small head の中間の長さの頭部(intermediate head)ができる。また遺伝子23 (ptg) や遺伝子24と野性株との同時感染では頭部の長いジャイアントファージ<sup>(52)~(54)</sup>ができる。

ここで注目される点はこれらの長さの変異が全ての頭部で正20面体になるとか、ジャイアントになるとか言うのではないという事である。変異を持っていると長さの異なった頭部が作られる割合が増すと言う事で正常な頭部も多く作られているのである。これはこれまでに述べてきた頭部関連構造体を作る変異と大いに違うところである。そしてもう一つ重要な点は長さは違うが幅はどれも同じであると言う事である。

正20面体の頭部から正常な頭部までは (I) のように考える。星型と星型を結ぶ gp22 のリボンは螺旋状に巻いている。正常な条件の場合、gp23 の集合の速さと gp22 の螺旋の回転による伸び縮みは正常頭部を作るような関係になっている。もし gp23 が変異しているところの関係のバランスが崩れていろいろな長さの頭部が作られると考えるのである。このように考える事により長さの異なった頭部が同じ変異で出来る事を説明する事が出来る。そして頭部の形を決めるのが core でありながら頭部の長さの変異が遺伝子23の変異によってもたらされるということも説明する事が出来る。

ジャイアントの場合は (II) のように考えられる。基本的には (I) と同じで core の周りに gp23 が集合する時、変異した gp23 の集合の速度が余りに遅

くなると core からコネクターが外れてしまうと仮定する。実際コネクターは外れやすくプロヘッド等の標品中で観察される事が多い。また浸透圧ショック等で尾部が外れる時コネクターのところで頭部から外れる。コネクターが外れる時 gp24 がこれに入れ替わる事が出来るのかもしれない。gp24 が存在しないとジャイアントファージが出来やすい事が示されている。基頂点やそれと対称の位置にある頂点のコネクターが外れると gp22 が結合して次々と星型が縦に連なった長い core が出来るとジャイアントになるのである。この場合図のように全ての星型にコネクターが付いている事も、全て外れてしまう事も充分あり得る事である。ジャイアントファージの gp24 の含まれる割合は正常ファージと余り変わらないというデータはこの事を示唆している。

in vitro の再構成実験でポリヘッドが枝分れしたり、一端だけが閉じているものが観察されるが gp20 の存在する時だけである。gp20 が無いと真っ直ぐな core を含んだポリヘッドが出来ただけである。この事実はポリヘッドの枝分れにもコネクターが必要である事を示唆している。(III)ではこの結果を説明している。枝分れは星型の一つのコネクターが外れたところに次の星型が結合して出来たものと考えられる。図では全ての星型にコネクターが付いているがコネクターの離れ具合により両端や一端が開いたポリヘッドができる。遺伝子24の変異によるジャイアントファージの形成も同様に考える事が出来る。変異した gp24 はプロヘッドが出来る前に作用してコネクターを早く星型から外してしまうのかもしれない。

## (b) 形の決定

頭部の形の決定は頭部の横幅と縦幅の決定を意味している。頭部が変形したものは遺伝子22や68など core 構造蛋白質の遺伝子の変異で発見されている。例えば遺伝子22の温度感受性突然変異体感染菌では、図9に例を上げているよ



うな変形した頭部が見られる。このような変形は色々なバリエーションがあるが基本的には20面体構造をしている事が分かる。すなわち図9に説明しているように頭部の幅を決めている軸の長さの変化である事が理解できる。図9では軸の長さの長くなった部分は点線で示してる。そして頭部の変形が core の遺伝子の変異によりもたらされることが無理なく説明できるのである。この点は頭部の長さの変異が頭部主要蛋白質をコードする遺伝子23による変異によりもたらされるのと対をなしている。この一見不思議な現象をこのモデルでは巧く説明できる。

T4 ファージは長い尾部を持っているので尾部の存在がよく分かる。野性のT4 ファージ感染菌においても尾部を2つ以上持ったものが見つかる。ところがジャイアントファージや頭部の変形したファージで尾部を2つ以上持っているものが多い事が報告されている。<sup>(54)(55)</sup> また遺伝子22や68の変異でも異形になった頭部に多くの尾部が結合している事が報告されている。<sup>(56)(57)</sup> この事実も core の先端にコネクターが結合していてこのコネクターがプロヘッ드의頂点になっていると言う事から理解できる。すなわち変異した gp23, gp24 ファージ外被蛋白質や、core 蛋白質の gp 22, gp 68の変異が尾部を多く持ったファージを生むのは gp23 や gp24 とコネクターの関係、core 蛋白質とコネクターの関係がこれらの変異で変ってしまったためにコネクターの外れるタイミングが狂ってしまった結果と考える事が出来る。

### 13) DNA パッケージング (DNA 詰込み反応)

二重鎖 DNA ファージの DNA パッケージングの機構はほぼ共通している。<sup>(58)(59)</sup> プロヘッドに DNA が入る現象であるが、  
a)プロヘッドは完成された頭部に較べると形が丸みを帯び、少し小さく内部に足場蛋白質 (scaffolding protein) とよばれる蛋白質を含んでいる。そのためバ

パッケージングの前か途中にプロヘッドから足場蛋白質が出てしまうか、あるいは酵素により消化されるかする。いずれにしても足場蛋白質と言う名のとおりの構造が完成してしまうと取り除かれてしまうのである。そして頭部外殻の拡大と構造変換が起り、20面体の頂点が顕著になりプロヘッドに較べると角ばった構造になる。

b) 基質の DNA はコンカテマーと言ってファージ DNA が縦に何本が連なった長い DNA である。ファージの種類により DNA の構造に違いがあるので各々のファージ特有の工夫をしてパッケージングが行われる。T4 の場合は、頭部がいっぱいになるまで DNA が詰込まれ、いっぱいになったら DNA が切られてパッケージングは終る。普通 T4 の頭部いっぱい DNA 量は T4 DNA 一つ分より少し長めになっている (103%)。それでコンカテマーを頭部いっぱいずつ切っていくと DNA の端が少しずつずれて T4 ファージ DNA の端が一定にならず、遺伝子地図を作ると環状になってしまうのである。

c) パッケージングに関係する蛋白質は2種類あって、分子量の大きいものと小さいものからなる。T3 ファージでは大きい方はプロヘッドに結合し DNA を切る活性を持つ。小さい方は DNA に結合し、プロヘッド、DNA、これら2種の蛋白質が複合体を作る。プロヘッドに DNA が結合する箇所はコネクターである。ラムダファージでは大きい方と小さい方が複合体を作り、これが DNA と結合し、さらにプロヘッドのコネクターに結合すると言われている。大きい蛋白質は cosN とよばれる決まった配列のところで DNA を切断する活性を持っている。他のファージでも大きい方の蛋白質が DNA を切断する活性を持っている。この大きい方の蛋白質は ATPase (ATP 分解酵素) の活性を持っている。ATP を分解して得られるエネルギーが DNA の移送に使われると考えられている。

DNA の切断の仕方がファージの種類により異なっているのでファージ特有

の端を持った DNA が出来るのである。しかし基本的には頭部の容量いっぱいの DNA が詰め込まれると切断が起ると考えられるデータが集まっている。ラムダ、T3、T7 など DNA の端が決まっている場合は頭いっぱいになると、ある決まった塩基配列のところで切断が起るので端から端まで同じ配列をした DNA を持つ事になる。

#### 14) 頭部の完成

DNA パッケージングが終わると頭部が完成したと考えられ、T3 ファージでは尾部蛋白質 gp11, gp12 がコネクターに結合し、尾部に gp17 からなる尾部繊維が結合してファージが完成する。<sup>(60)</sup> T4 ファージの場合はキャプシッドに DNA が入った頭部に gp13, gp14 が結合してネックを作り、ネックに尾部が結合する。<sup>(61)</sup> このネックにウイスキーが結合するのであるが、このネックは T3 ファージの尾部とよく似ている。T3 の尾部は2つの蛋白質からなりそこに6本の尾部繊維が付いており、<sup>(62)</sup> T4 のウイスキーとよく似た構造をしている(図1)。

このように考えると進化的には T3 のようなファージに大きな尾部が結合したものが T4 であると考えられる。T3 では尾部繊維はファージの生存に必須で遺伝子17が変異すると宿主に吸着できなくて増殖できなくなるが、<sup>(63)</sup> T4 には立派な尾部と尾部繊維があるのでウイスキーが無くても生存には関係しないのである。

#### おわりに

はじめに、で触れたように遺伝情報の発現は蛋白質によりなされるので、遺伝子の働きを知るには蛋白質の働きを調べればよい。ファージの研究は遺伝子

と蛋白質の対応が付けやすいので多くの成果を生んだ。ファージ形態形成の分野においても非常に詳しく研究がなされているが、しかしまだまだ多くの問題を残している。細菌やファージの研究で生命現象の基本的なところが分かり高等生物においても同じようであると言う事が確認された。しかし高等生物の研究が進むにつれて当然の事ながら高等生物特有の現象も見つかってきたのである。新しい知識が増えるほど問題点が明確になり多くの未知の部分が知覚されるようになる。宇宙の知識が増えるにつれて我々の宇宙も果てしなく広がって行くのと同じであるという思いがする。

#### 引用文献

- (1) Stahl, F. W., R. S. Edgar. and J. Steinberg (1964) The linkage map of bacteriophage T4. *Genetics*. 50 ; 539-552.
- (2) Streisinger, G., R. S. Edgar, and G. H. Denhardt (1964) Chromosome structure in phage T4. I. Circularity of the linkage map. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 52 ; 775-779.
- (3) “Bacteriophage T4” Mathews, C. K., E. M. Kutter, G. Mosig, P. B. Berget (1983) American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- (4) 加藤尚子 ; T3 ファージの尾部繊維の構造、大谷学報 第66巻(昭和61年) 1-10。
- (5) Hershey, A. D., and M. Chase (1952) Independent function of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36 ; 39-56.
- (6) Crick, F. H. C., and J. D. Watson (1957) The structure of small viruses. *Nature (London)* 177 ; 473-475.
- (7) Crick, F. H. C., and J. D. Watson (1957) Virus structure : General principles. *Ciba Found. Symp.* 5-13.
- (8) Caspar, D. L. D., and A. Klug (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27 ; 1-24
- (9) Epstein, R. H., A. Bolle, C. Steinberg, E. Kellenberger, E. Boy dela Tour,

- R. Chevalley R. Edgar, M. Suman, C. Denhardt, and I. Lielausis (1964) Physiological studies of conditional lethal mutants of bacteriophage T4D. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 ; 375-392.
- (10) Laemmli, U. K., and F. A. Eiserling (1968) Studies on the morphopoieses of the head of phage T-even. IV. The formation of polyhead. Mol. Gen. Genet. 101 ; 333-345.
- (11) Laemmli, U. K., E. Molbert, M. Show, and E. Kellenberger (1970) Form determining fuction of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 49 ; 99-113.
- (12) Edger, R. S., and W. B. Wood (1966) Morphogenesis of bacteriophage T4 in extracts of mutant-infected cells. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 55 ; 498-505
- (13) Wood, W. B. (1979) Bacteriophage T4 assembly and morphogenesis of subcellular structure. Harvey Lect. 73 ; 203-222.
- (14) Laemmli, U. K., F. Beguin, and G. Gujer-Kellenberger (1970) A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. J. Mol. Biol. 47 ; 69-85.
- (15) Coppo, A., A. Manzi, J. F. Pulitzer, H. Takahasi (1973) Abortive bacteriophage T4 head assembly in mutants of Esherichia coli. J. Mol. Biol. 76 ; 61-87.
- (16) Simon, L. D., J. M. McLanghlin, D. Snover, J. Ou, C. Grisham, and M. Loeb (1975) E. coli membrane lipid alteration affecting T4 morphogenesis. Nature (London) 256 ; 379-383.
- (17) Binkowski, G., and L. D. Simon (1983) Host functions that affect T4 reproduction. " Bacteriophage T 4 " p. 342-350 (3) 参照
- (18) Kellenberger, E. (1968) Studies on the morphopoiesis of the head of phage T-even. V. The components of the T4 capsid-related structures. Virology 34 ; 549-561.
- (19) Carrascosa, J. L. (1986) In electron microscopy of proteins. vol. 5. Viral structure (Harris, J. R., & Horne, R. W., eds) Academic Press Inc., New York.

- (20) Bazinet, C. and J. King (1985) The DNA translocating vertex of DSDNA bacteriophage. *Ann. Rev. Microbiol.* 39; 109-129.
- (21) Driedonks, R. A., A. Engel, B. Ten Heggeler, and R. van Driel (1981) Gene 20 product of bacteriophage T4. Its purification and structure. *J. Mol. Biol.* 152; 641-662.
- (22) Black, L. W., and M. K. Showe, Morphogenesis of the T4 head. "Bacteriophage T4" p. 219-245. (3) 参照。
- (23) van Driel, R. (1977) Assembly of bacteriophage T4 head-related structures. Assembly of polyhead in vitro. *J. Mol. Biol.* 114; 61-78.
- (24) Caldentey, J., and E. Kellenberger (1986) Assembly and disassembly of bacteriophage T4 polyheads. *J. Mol. Biol.* 188; 39-48.
- (25) Showe, M. K., E. Isobe, and L. Onorato (1976) Bacteriophage T4 prehead proteinase. II. Its cleavage from the product of gene 21 and regulation in phage-infected cells. *J. Mol. Biol.* 197; 55-69.
- (26) Müller-Salamin, L., L. Onorato, and M. K. Showe (1977) Localization of minor protein components of the head of bacteriophage T4. *J. of Virology* 24; 121-134.
- (27) Onorato, L., B. Stirmar, and M. K. Showe (1978) Isolation and characterization of bacteriophage T4 mutant preheads. *J. of Virology* 27; 409-426.
- (28) Hemmingsen, S. M., C. Woolford, S. M. van der Vies, K. Tilly, D. T. Dennis et al (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly, *Nature* 333; 330-334.
- (29) Zeilstra-Ryalls, J., C. Fayyet, and C. Georgopoulos (1991) The universally conserved groE (Hsp60) chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45; 301-325.
- (30) Doermann, A. H., and L. D. Simon (1984) Bacteriophage T4 bypass31 mutations that make gene 31 nonessential for bacteriophage T4 replication: mapping bypass31 mutations by UV rescue experiments. *J. of Virology* 51; 315-320.
- (31) Simon, L. D., and B. Randolph (1984) Bacteriophage T4 bypass31 mutation that make gene 31 nonessential for bacteriophage T4 replication: Isolation and characterization. *J. of Virology* 51; 321-328.

- (32) Kato, H., and C. Bashong (未発表)
- (33) Huang, W. H. (1975) Membrane associated proteins of T4-infected *Escherichia coli*. *Virology* 66 ; 508-521.
- (34) Matsuo-Kato, H., and H. Fujisawa (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.
- (35) Simon, L. D. (1972) Infection of *Escherichia coli* by T2 and T4 bacteriophages as seen in the electron microscope : T4 head morphogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 69 ; 907-911.
- (36) Bijlenga, R. K. L., R. van der Broek, and E. Kellenberger (1974) The transformation of tau-particles into T4 heads, *J. Supramol. Struct.* 2 ; 45-59.
- (37) van Driel, R. (1980) Assembly of bacteriophage T4 head-related structures. IV. Isolation and association of T4 prehead proteins. *J. Mol. Biol.* 138 ; 27-42.
- (38) Traub, F., and M. Maeder (1984) Formation of the prohead core of bacteriophage T4 in vivo. *J. of Virology* 49 ; 892-901.
- (39) Kuhn, A., B. Keller, M. Maeder, and F. Traub (1987) Prohead core of bacteriophage T4 can act as intermediate in the T4 head assembly pathway. *J. of Virology* 61 ; 113-118.
- (40) van Driel, R., and E. Couture (1978) Assembly of bacteriophage T4 head-related structures. II. In vitro assembly of prehead-like structures. *J. Mol. Biol.* 123 ; 115-128.
- (41) van Driel, R., and E. Couture (1978) Assembly of the scaffolding core of bacteriophage T4 preheads, *J. Mol. Biol.* 123 ; 713-719.
- (42) Caldentey, J., J. Lepault, and E. Kellenberger (1987) Isolation and reassembly of bacteriophage T4 core proteins. *J. Mol. Biol.* 195 ; 637-647.
- (43) Kato, H. (未発表)
- (44) Kochan, J., H. Murialdo (1983) Early intermediates in bacteriophage lambda prohead assembly. II. Identification of biologically active intermediates. *Virology* 131 ; 100-115.

- (45) Dickson, R. C., S. L. Barnes, and F. A. Eiserling (1970) Structural proteins of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 53 ; 461-474.
- (46) Carrascosa, J. L., and E. Kellenberger (1978) Head maturation pathway of bacteriophage T4 and T2. III. Isolation and characterization of particles produced by mutants on gene 17. *J. of Virology* 25 ; 831-844.
- (47) Dewey, M. J., J. S. Weberg, and F. R. Frankel (1974) Genetic control of whisker antigen of bacteriophage T4D. *J. Mol. Biol.* 84 ; 625-634.
- (48) Driedonks, R. A., and J. Caldentey (1983) Gene 20 product of bacteriophage T4, II. Its structural organization in prehead and bacteriophage. *J. Mol. Biol.* 166 ; 341-360.
- (49) 藤沢久雄、加藤尚子 (1990) バクテリオファージ形態形成におけるコネクターの役割。日本電子顕微鏡学会 24 ; 191-198。
- (50) 加藤尚子 (1990) バクテリオファージのコネクターの存在様式と彼割について。大谷大学真宗総合研究所紀要 8 ; 35-42.
- (51) Engel, A., van Driel, R., and Driedonks, R. (1982) A proposed structure of the prolate phage T4 prehead core. *J. of Ultrastructure Res.* 80 ; 12-22.
- (52) Doermann, A. H., F. A. Eiserling, and L. Boehner (1973) Genetic control of capsid length in bacteriophage T4. I. Isolation and preliminary description of four mutants. *J. of Virology* 12 ; 374-385.
- (53) Doermann, A. H., A. Pao, and P. Jackson (1987) Genetic control of capsid length in bacteriophage T4 : clustering of ptg mutations in gene 23. *J. of Virology* 61 ; 2823-2827.
- (54) Bijlenga, R. K. L., U. Aebi, and E. Kellenberger (1976) Properties and structure of a gene 24-controlled T4 giant phage. *J. Mol. Biol.* 103 ; 469-498.
- (55) Paulson, J. R., S. Lazaroff, and U. K. Laemmli (1976) Head length determination in bacteriophage T4 : the role of the core protein p22. *J. Mol. Biol.* 103 ; 99-109.
- (56) Keller, B., C. Sengstag, E. Kellenberger, and T. A. Bickle (1984) Gene 68, a new bacteriophage T4 gene which codes for the 17k prohead core protein is involved in head size determination. *J. Mol. Biol.* 179 ; 415-430.



- (57) Keller, B., J. Dubochet, M. Adrian, M. Maeder, M. Wurtz, and E. Kellenberger (1988) Form determining scaffold genes of bacteriophage T4. *J. of virology* 62 ; 2960-2969.
- (58) Black, L. W. (1989) DNA packaging in dsDNA bacteriophages. *Annu. Rev. Microbiol.* 43 ; 267-292.
- (59) Murialdo, H. (1991) Bacteriophage lambda DNA maturation and packaging. *Annu. Rev. Biochem.* 60 ; 125-153.
- (60) Matsuo-Kato, H., H. Fujisawa, and T. Minagawa (1981) Structure and assembly of bacteriophage T3 tails. *Virology* 109 ; 157-164.
- (61) Edgar, R. S., and I. Lielausis (1968) Some steps in the assembly of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 32 ; 263-276.
- (62) Kato, H., H. Fujisawa, and T. Minagawa (1985) Purification and characterization of gene 17 product of bacteriophage T3. *Virology* 146 ; 22-26.
- (63) Kato, H., H. Fujisawa, and T. Minagawa (1985) Genetic analysis of subunit assembly of the tailfiber of bacteriophage T3. *Virology* 146 ; 12-21.

(平成 4 年10月 5 日受付)