

T3, T7ファージの複製と遺伝子発現

橋本主税・藤澤久雄

T3, T7ファージの生活環とその遺伝子支配機構の分子レベルでの解析は、2本鎖DNAファージの中でもっともすすんでいる。両者は近縁で、DNA配列の相同性が高く、遺伝子の構成・機能・発現調節、DNA複製、形態形成などの諸過程の分子機構は同一であると考えられている。しかし、転写や頭部へのDNA詰込みはT3/T7間で高い特異性をもつことが明らかにされ、そのDNA分子認識機構が解明されつつある。これらの研究成果は他のウイルスをはじめとする生命系の研究やバイオテクノロジーに生かされている。

はじめに ビルレントファージであるT系のなかでもっとも小型のT3とT7は、DNAを凝縮して詰め込んだ正20面体の頭部(50×50 nm)と尾部(20×15 nm)からなる(図1)。ゲノムDNAはユニークな配列の約40 kbpの線状2本鎖で、両端に同一配列(末端反復配列; T3: 230 bp¹⁾, T7: 160 bp²⁾)をもつ。ゲノムDNA上には50の遺伝子がコードされており、ほとんどの遺伝子がオーバーラップすることなく全DNAの95%をコーディング配列に使っている²⁾。コーディング配列以外にはプロモーター、複製起点、RNase III切断部位、転写のターミネーターなどが経済的に並んでいる³⁾(図2)。T3/T7は小型であるがゆえに、生活環やその遺伝子支配機構の研究がよくすすんでおり、ユニークさが明らかになっている。たとえば、ほとんどのファージでは転写に宿主RNAポリメラーゼを修飾して用いるが、T3/T7は自前の単一ポリペプチドのRNAポリメラーゼをもつ⁴⁾。また、後期遺伝子の発現は、普

通ファージDNAの合成を必要とするが、T3/T7では、DNA合成に依存せずに起こるので、形態形成の研究には有利であり、ファージの頭部は蛋白質の集合によって形成された頭殻前駆体にDNAが詰め込まれてできる

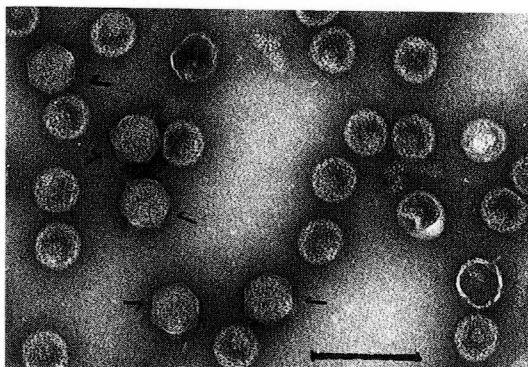


図1. T3ファージのプロヘッドと成熟粒子
スケールは0.1 μm, 矢印は成熟頭部。

Chikara Hashimoto*, Hisao Fujisawa, 京都大学理学部植物学教室 (〒606 京都市左京区北白川追分町) [Department of Botany, Faculty of Science, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan] *現在: 東京大学医学部疾患遺伝子制御(サンド)講座 (〒113 東京都文京区本郷7-3-1) [Department of Disease-related Gene Regulation Research(Sandoz), Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan]

Replication and Gene Expression of Bacteriophages T3 and T7 (or Phages T3 and T7)

Key word 【T3ファージ】【T7ファージ】【生活環】【遺伝子支配機構】

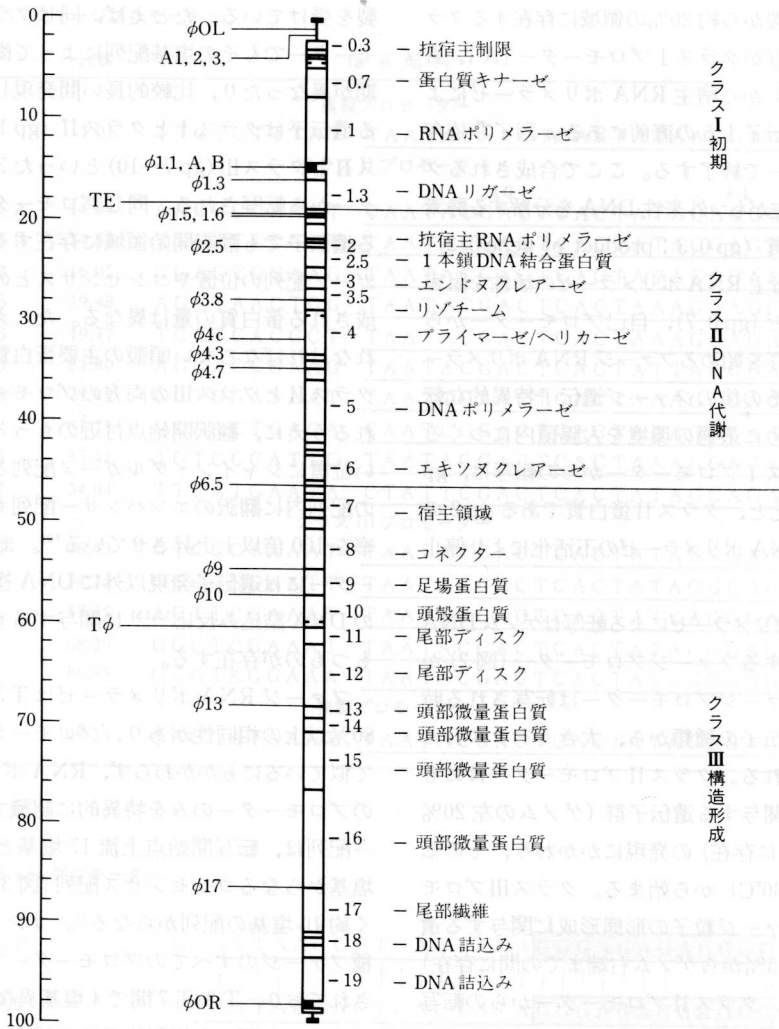


図 2. T 7 ファージの遺伝子地図²⁾

T 3/T 7 ファージは DNA を大腸菌内に一方の端から注入する。この端を左端として、初めに同定された遺伝子は右方向に 1 から 19 までの整数番号で、その後同定された遺伝子はその位置に応じ小数点を付した番号で表わす。A および TE はそれぞれ宿主 RNA ポリメラーゼのプロモーターおよび転写終結点、 ϕ および T ϕ はそれぞれファージ RNA ポリメラーゼのプロモーターおよび転写終結点。ゲノム上の位置は左端を 0, 右端を 100 とした相対値で表わす。

という画期的な発見も T 3 によってなされた⁵⁾。T 3/T 7 間では、遺伝子構成や DNA 配列がよく保存されており、遺伝子の発現調節、DNA 複製、形態形成などは同じ機構によると考えられているが、ファージ RNA ポリメラーゼのプロモーター認識⁶⁾ や頭部形成における DNA 詰込み⁷⁾ には、T 3/T 7 間で高い特異性がみられるので、T 3/T 7 の生活環の理解には、これらの過程での分子認識機構が解明されなければならない。本稿で

は、T 3/T 7 の遺伝子発現、DNA 複製および形態形成過程を概観し、これらのなかでみられる DNA 分子認識機構についての最近の知見をまとめた。

I. 遺伝子発現の調節

T 3/T 7 ファージ遺伝子はゲノムの左から右へ方向に発現する²⁾。ファージ DNA が大腸菌内に注入される

と、まずゲノム左端から約20%の領域に存在するクラス I 遺伝子群の転写がクラス I プロモーター (A 1, A 2, A 3, B, C, E) から宿主 RNA ポリメラーゼによって行なわれ、遺伝子 1.5 の直前にある ρ 因子非依存性のターミネーターで終了する。ここで合成されるクラス I 蛋白質は宿主がもつ外来性 DNA を分解する酵素を不活化する蛋白質 (gp 0.3; product of gene 0.3) やリン酸化により宿主 RNA ポリメラーゼの活性を阻害する蛋白質キナーゼ (gp 0.7), 自己プロモーターからの後期遺伝子の転写を始めるファージ RNA ポリメラーゼ (gp 1) などで、その後のファージ遺伝子特異的な転写を行なわせるために最適の環境を大腸菌内につくる働きをもつ。クラス I プロモーターからの転写は、gp 0.7 によるリン酸化と、クラス II 蛋白質である gp 2 の結合による宿主 RNA ポリメラーゼの不活化により停止する⁸⁾。

ファージ RNA ポリメラーゼによる転写はゲノム DNA 上に十数カ所存在するファージプロモーター (図 2) から始まる。このファージプロモーターは転写される時期とコードする遺伝子の種類から、大きくクラス II とクラス III に分けられる。クラス II プロモーターはおもに DNA の代謝に関与する遺伝子群 (ゲノムの左 20% から 45% のところに存在) の発現にかかわり、その転写は感染後 6 分 (30°C) から始まる。クラス III プロモーターはおもにファージ粒子の形態形成に関与する遺伝子群 (ゲノム左 45% からゲノム右端までの間に存在) の発現にかかわり、クラス II プロモーターからの転写が終了したのち (感染後 8 分) に転写が始まり、溶菌 (感染後約 23 分) まで続く。この転写時期の差は、DNA の注入が転写や翻訳に比べてゆっくりとすすむので、クラス II プロモーターからの転写が先に起こるが、クラス III プロモーターはクラス II プロモーターよりも強いため、クラス III プロモーターからの転写が可能になるときは、クラス II プロモーターからの転写が抑えられることによると考えられている。またクラス II 蛋白質であるリゾチーム (gp 3.5) はファージ DNA ポリメラーゼの活性を阻害することが知られているが、これもクラス II プロモーターからの転写の特異的な阻害に関与している⁹⁾。すべての転写産物は RNase III によるプロセッシングを受けるが、発現の調節には関係ない³⁾。

ファージ遺伝子の発現は基本的には上述のように転写により調節されているが、それぞれのプロモーターからの転写時期や各遺伝子の発現量などは、微妙な調

製を受けている。たとえば、同じクラスに属するプロモーターでもその塩基配列によって微妙に転写開始時期が異なったり、比較的長い間発現し続ける必要がある遺伝子はクラス I とクラス II (gp 1.1~1.3) やクラス II とクラス III (gp 7~10) といった 2 種類のプロモーターから転写される。同じプロモーターから転写される遺伝子でも翻訳開始領域に存在するシャイン・ダルガーノ配列の位置やコンセンサスとの相違によって合成される蛋白質の量は異なる。たとえば、大量合成されなければならない頭殻の主要蛋白質の遺伝子 10 は、クラス II とクラス III の両方のプロモーターから転写されるうえに、翻訳開始点付近のもっとも翻訳効率のよい位置にシャイン・ダルガーノ配列と、さらに遺伝子の配列内に翻訳のエンハンサー配列も存在し、翻訳効率を 100 倍以上上昇させている¹⁰⁾。またファージプロモーターには遺伝子発現以外に DNA 複製¹¹⁾ や頭殻内への DNA 詰込み反応^{12,13)} に関与するものなどの機能をもつものが存在する。

ファージ RNA ポリメラーゼは T 3/T 7 間で構造上 80% 以上の相同性があり、プロモーター配列もきわめて似ているにもかかわらず、RNA ポリメラーゼは自己のプロモーターのみを特異的に認識する。プロモーター配列は、転写開始点上流 17 塩基と下流 6 塩基の 23 塩基からなるコンセンサス配列 (図 3 A) と、それに続く約 10 塩基の配列からなる²⁾。コンセンサス配列は同種ファージのすべてのプロモーターではほぼ完全に保存されており、T 3/T 7 間で 4 塩基異なるが、キメラプロモーターを用いた転写特異性の解析から 23 塩基中の 3 塩基 (-10~-12) をそれぞれのファージ RNA ポリメラーゼが識別していることがわかっている¹⁴⁾。また十数カ所存在するプロモーターのうち、T 3/T 7 間でそれぞれ対応するプロモーターのコンセンサス配列下流の配列は、互いにかなり保存されており、これら T 3/T 7 間で対応するプロモーターは互いに同様な性格をもっていると考えられる。これらのことから、T 3/T 7 間のプロモーター認識の特異性はコンセンサス配列が、そのプロモーターの性格は下流の配列で決定していると考えられる。また T 3/T 7 のキメラ RNA ポリメラーゼの解析から、C 末端ドメインにプロモーター特異性を決定する部位が存在することが明らかになっている¹⁵⁾。

(A) T7 ファージプロモーター

プロモーター	位置	塩基配列
複製プロモーター		
φOL	1.01	TTGTCTTTAT <u>TAATACA</u> ACTCACTATAAGGAGAGA
クラスIIプロモーター		
φ1. 1A	14.64	AACGCCAAAT <u>CAATACG</u> ACTCACTATAGAGGGACA
φ1. 1B	14.83	TTCTTCCGGT <u>TAATACG</u> ACTCACTATAGGAGAACC
φ1. 3	16.05	GGA CTGGAAG <u>TAATACG</u> ACTCAGTATAGGGACAAT
φ1. 5	19.48	AGTTAACTGG <u>TAATACG</u> ACTCACTAAAGGAGGTAC
φ1. 6	19.77	TGGTCA CGCT <u>TAATACG</u> ACTCACTAAAGGAGACAC
φ2. 5	22.80	AGCACCGAAG <u>TAATACG</u> ACTCACTATTAGGGGAAGA
φ3. 8	27.99	CGTGGATAAT <u>TAATTGA</u> ACTCACTAAAGGGAGACC
φ4 c	31.73	CCGACTGAGA <u>CAATCCG</u> ACTCACTAAAGAGAGAGA
φ4. 3	33.41	AGTCCCATTTC <u>TAATACG</u> ACTCACTAAAGGAGACAC
φ4. 7	34.84	TTCATGAATA <u>CTATTTCG</u> ACTCACTATAGGAGATAT
クラスIIIプロモーター		
φ6. 5	46.43	GTCCCTAAAT <u>TAATACG</u> ACTCACTATAGGGAGATA
φ9	54.75	GCCGGGAATT <u>TAATACG</u> ACTCACTATAGGGAGACC
φ10	57.35	ACTTCGAAAT <u>TAATACG</u> ACTCACTATCAGGGAGCC
φ13	68.29	GGCTCGAAAT <u>TAATACG</u> ACTCACTATAGGGAGAAC
φ17	86.55	GCGTAGGAAA <u>TAATACG</u> ACTCACTATAGGGAGAGG
複製プロモーター		
φOR	98.23	CACGATAAAT <u>TAATACG</u> ACTCACTATAGGGAGAGG

(B) pac プロモーター

T3, pacB	5' GCATTA** <u>CTCACTAAA</u> GGGAGAGAGGGGAC
T7, φOR	5' TTAATACGACTCACTATA <u>GGGAGAGGAGGG</u> AC

コンセンサス配列 GAストレッチ

図3. ファージのプロモーター配列²⁾

転写開始点を+1, コンセンサス配列を下線で示す。

(A) T7 ファージ RNA ポリメラーゼの全プロモーターの名称, 位置および塩基配列。

(B) T3 の pacB プロモーターとそれに相当する T7 の φOR プロモーターの配列, 相同な塩基を縦線で GA ストレッチを影付きで示す。*: T3/T7 プロモーター特異性決定領域。

II. DNA 複製

T3/T7 ファージの DNA 複製には少なくとも gp1, gp1.3, gp2, gp2.5, gp3, gp4, gp5 および gp6 と宿主のチオレドキシシンが必要である¹⁶⁾。このうち gp1.3 と gp2.5 は宿主の相当する蛋白質で置き換えられる。DNA の半保存的複製には gp5 とチオレドキシシン

が複合体を形成したファージ DNA ポリメラーゼと gp4 が必要である。gp4 は遺伝子4の転写産物上の2カ所の翻訳開始シグナルから分子量の異なる2種類の蛋白質(63Kと56K)として合成される¹⁷⁾。前者はプライマーゼとヘリカーゼ活性を有するが、後者はヘリカーゼ活性のみをもち、両者はヘテロ2量体を形成して複製フォーク上で二重らせん構造の開裂とラギング鎖合成のためのプライマー合成を行なう(図4¹⁸⁾)。ラギン

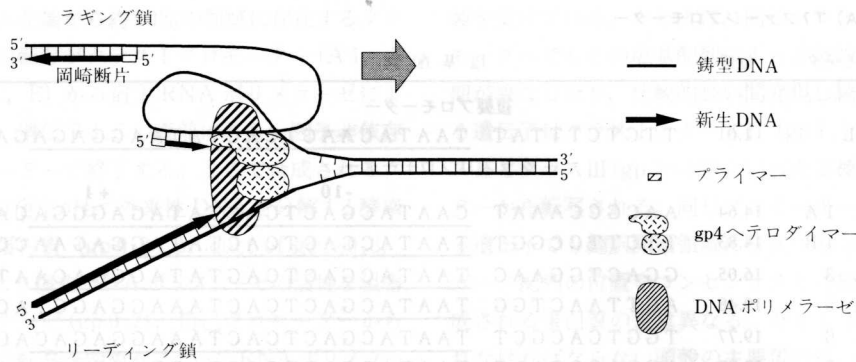


図 4. T7ファージの複製フォークモデル (文献 18 より改写)

この図では便宜上複製フォーク上の DNA ポリメラーゼを 1 分子としているが、一般には 2 分子がホモダイマーを形成してリーディング鎖とラギング鎖のそれぞれの合成を行なうと考えられている。

グ鎖合成のプライマーは、プライマーゼ認識配列の 3' CTGGG 5' から合成される^{11,19)}。プライマーからのヌクレオチド重合反応はファージ DNA ポリメラーゼが行なう。gp 5 単独では短鎖しか合成できず (1~50 ヌクレオチド)、宿主のチオレドキシソと 1 対 1 の複合体となって初めて長鎖の合成 (>1 万ヌクレオチド) が可能となる²⁰⁾。gp 3 と gp 6 は宿主 DNA を分解し自己 DNA 合成のヌクレオチドプールをつくと同時に、組換えにも必要である。さらに、gp 6 はプライマー除去²¹⁾ や DNA 成熟反応²²⁾ にも働いている。

ファージ DNA 合成は第 1 複製起点から始まる。第 1 複製起点はゲノムの左から 14.7% から 15.1% までの約 130 gp の領域で、タンデムに並んだ 2 つのファージプロモーター ($\phi 1.1 A$ と $\phi 1.1 B$) と、それに続く 61 塩基の AT に富む領域 (78% AT) からなる¹¹⁾。in vitro ではこのプロモーターから合成された RNA がプライマーとなって DNA 合成が開始する。この RNA 合成から DNA 合成への変換は普通 AT に富む領域内で行なわれているが、その機構については不明である。第 1 複製起点を欠くときは、複製はゲノム DNA 上に複数存在する第 2 複製起点から始まる^{16,23)}。複製起点から DNA 合成反応は両方向にすすむので、Y 字状の中間体を経て、2 本の単量体の DNA が合成される。すべての DNA ポリメラーゼとヌクレオチドの重合に 3' OH 基を必要とするので、T 3/T 7 ファージに限らず線状 2 本鎖 DNA の 5' 末端の完全複製は不可能であるが、ファージ DNA の場合ゲノム DNA の末端反復配列を介して head-to-tail 状に結合したコンカテマーとなり、頭部形成時にコンカテマーからゲノム DNA が切り出されること (DNA 成熟) によって完全複製を可能にしている。コンカテ

マー形成機構はファージにより多様であるが、T 3/T 7 の場合まず gp 6 (5', 3'-エキソヌクレアーゼ) の作用によって末端反復配列部分が 1 本鎖となり、次に gp 2.5 がこの領域に結合して他の DNA 分子の相同領域と対合させることによってコンカテマーになる²⁴⁾。また gp 2 がコンカテマー形成に関与するといわれているが、その機構は不明である。

III. ファージ粒子形成

ファージ粒子の形成は大きく分けて①頭殻前駆体(プロヘッド)形成、②プロヘッドへの自己 DNA 詰込みによる頭部の成熟、③成熟頭部への尾部および尾部繊維の結合、という 3 つの過程に分けて考えられる (図 5)。

1. プロヘッド形成

T 3/T 7 の成熟した頭部は正 20 面体であるが、プロヘッドは成熟頭部よりも小さい、球形に近い構造体である。成熟した頭部の 12 の頂点 (5 回対称性) の 1 つは対称性の異なる尾部 (6 回対称性) と結合する特殊な頂点 (基頂点) である。基頂点には DNA の出入口であり、尾部が結合するコネクターとよばれる構造体が局在している。成熟頭部には存在しないがプロヘッドの構築過程には必須である“足場蛋白質 (gp 9)”とコネクターが結合してプロヘッドの形成核になり、その周囲に頭殻蛋白質 (gp 10) が集合してプロヘッドを形成する。コネクターは gp 8 の 12 量体で、基部では 12 回対称であり先端では 6 回対称性をもつ構造で、中央に DNA の通る穴がある²⁵⁾ (図 5)。小型で球形のプロヘッドは DNA の詰込みに伴って拡大変換を起こし、完成し

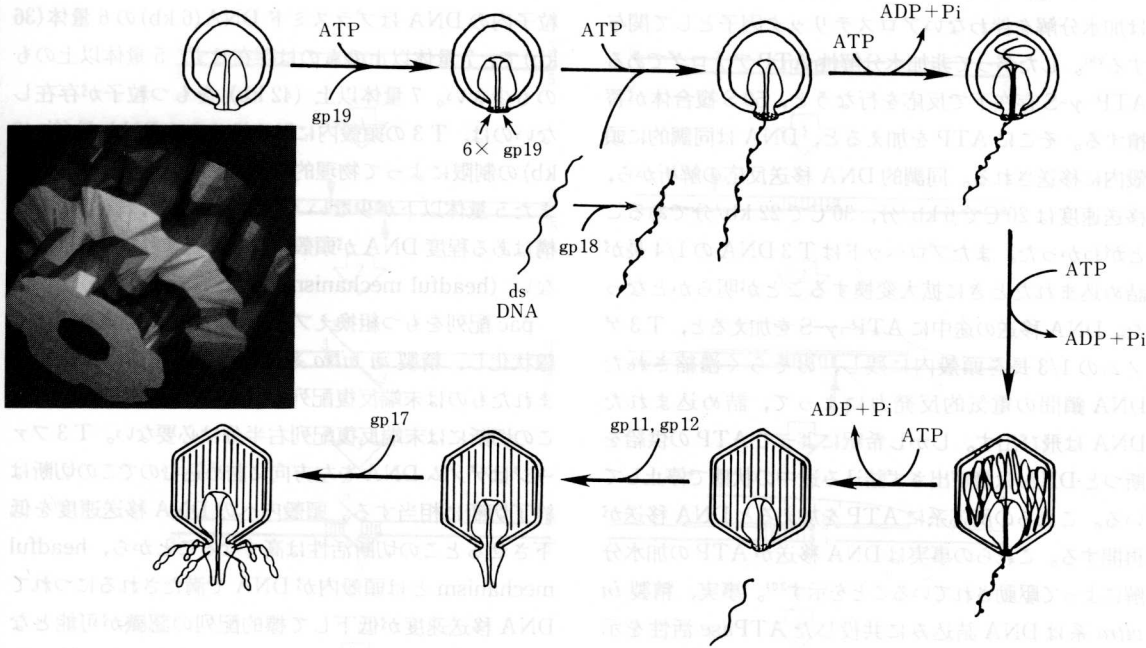


図5. T3/T7ファージ粒子形成経路
写真はコネクター⁴¹⁾。

た粒子にみられるような安定な正20面体になる。拡大変換に伴って足場蛋白質が消失するが、その機構は不明である。

2. DNA 詰込み反応

(コンカテマーのプロセッシングと頭部成熟)

プロヘッドへのDNAの詰込みは、ATPのエネルギーによって細胞内密度の5,000倍にもDNAを凝縮して頭殻内へ詰め込む反応で、ファージ粒子形成過程のなかでもっとも動的な反応である。DNA詰込み反応は、①自己DNAの識別およびコンカテマーの切断(開始切断)、②生じたDNA端からのDNAの頭殻内への移送、③1ゲノム長詰め込んだあとの切断によるコンカテマーからの切り離し(終了切断)、の3つの素過程に分けて考えることができる。DNA詰込み反応の解析には、これまでファージ感染菌の抽出液からなる粗 *in vitro* 系が用いられてきたため、反応因子や反応中間体の同定がむずかしく、詰込み活性は完成したファージ粒子の生物活性としてしか測定できなかった。DNA詰込み反応の解析は困難であった。しかし、T3ファージで、精製した因子(プロヘッド、詰込み蛋白質であるgp18とgp19、ATP、 Mg^{2+} 、ポリアミン)のみからなる *in*

vitro 詰込み系(精製 *in vitro* 系)が開発されてから²⁶⁾、詰込み反応の分子レベルでの解析が飛躍的にすすんだ。

T3ファージの精製 *in vitro* 系は、1本鎖DNAや環状2本鎖DNAを詰め込むことができないが、線状の2本鎖DNAであればその配列に関係なく、加えたDNAのほとんどを詰め込むほどの高い詰込み効率をもつ¹³⁾。この系では、二重らせんの大きい溝(major groove)にグリコシルヒドロキシメチル基が突出していると考えられるT4DNAを詰め込むが、塩基対間に挿入されて二重らせんの周期を変化させる薬剤(アクチノマイシンD、臭化エチジウム)やDNAの溝に結合する薬剤(ジスタマイシンA)によって詰込みは阻害されることから、DNA詰込みには、詰込み装置がDNAの規則的ならせん構造を認識することが重要であるといえる²⁷⁾。

詰込み蛋白質であるgp18は線状DNA結合蛋白質であり、gp19はATP結合、プロヘッド結合、非特異的二重鎖DNA切断、特異的DNA配列の認識などの活性をもつ多機能蛋白質である²⁸⁾。DNA詰込み反応では、6分子のgp19と結合したプロヘッド(プロヘッド-gp19複合体)と、gp18-DNA複合体が結合して、沈降係数50Sの詰込み前駆体(50S複合体)となる。プ

ロヘッド-gp 19 複合体と 50 S 複合体の形成に、ATP は加水分解を伴わないアロステリック因子として関与する²⁹⁾。したがって非加水分解性 ATP アナログである ATP- γ -S 存在下で反応を行なうと、50 S 複合体が蓄積する。そこに ATP を加えると、DNA は同調的に頭殻内に移送される。同調的 DNA 移送反応の解析から、移送速度は 20°C で 6 kb/分、30°C で 22 kb/分であることがわかった。またプロヘッドは T 3 DNA の 1/4 長が詰め込まれたときに拡大変換することが明らかとなった。DNA 移送の途中に ATP- γ -S を加えると、T 3 ゲノムの 1/3 長を頭殻内に残し、おそらく濃縮された DNA 鎖間の電気的反発力によって、詰め込まれた DNA は飛び出す。しかし希釈によって ATP の供給を断つと DNA は飛び出さず詰込み途中の状態で停止している。これらの反応系に ATP を加えると DNA 移送が再開する。これらの事実は DNA 移送が ATP の加水分解によって駆動されていることを示す³⁰⁾。事実、精製 *in vitro* 系は DNA 詰込みに共役した ATPase 活性を示し、計算上 1 分子の ATP で約 1.8 bp を移送している。DNA 移送におけるエネルギー変換機構については、いくつかのモデルが出されているが、T 3 ファージの研究から、筆者らはコネクターの 6 回対称構造の各ドメインに 1 分子の gp 19 (計 6 分子) が結合し、1 対の gp 19 が DNA ラゼンの糖-リン酸鎖に結合し、ATP の結合、分解、除去による gp 19 の構造変換と DNA 結合能力の変化が組み合わさって、DNA を頭殻内に引き込むというモデルを提唱している。このモデルによれば、らせん 1 回転 (10.3 bp) を動かすのに 6 分子の ATP を消費することになり、ATP 1 分子あたり 1.72 bp (10.3/6) となるので³¹⁾、実験結果と一致する。

in vivo や粗 *in vitro* 系では、T 3/T 7 ファージは互いに相手の DNA を低い効率でしか詰め込まない。この特異性を有する系では、加えた DNA はコンカテマーとなったあとに詰め込まれるのに対して⁷⁾、特異性を失った精製 *in vitro* 系では加えた DNA はコンカテマー形成を行わずそのまま詰め込まれる。これらの事実は、詰込みの特異性はコンカテマーから単位長 DNA を切り出す過程にあり、T 3/T 7 の詰込み装置がコンカテマーの特定領域を認識して切断する機構が存在することを示唆する。このファージ DNA の詰込みに必要な DNA 上のシグナル (pac シグナル) を組み込んだプラスミドをもつ大腸菌にファージを感染させると、プラスミド DNA はコンカテマーになり、ファージ DNA と同じ機

構で詰め込まれ、形質導入粒子を形成する。形質導入粒子内の DNA はプラスミド DNA (6 kb) の 6 量体 (36 kb) で、7 量体以上のものは存在せず、5 量体以上のものも少ない。7 量体以上 (42 kb) をもつ粒子が存在しないのは、T 3 の頭殻内に詰め込みうる DNA 量 (約 40 kb) の制限によって物理的に詰め込めないためである。また 5 量体以下が少ない (1% 以下) のは、終了切断機構はある程度 DNA が頭殻内に詰め込まれなければ働かない (headful mechanism) ためであろう³²⁾。

pac 配列をもつ組換えプラスミドを制限酵素を用いて線状化し、精製 *in vitro* 系に加えると左方向に詰め込まれたものは末端反復配列の左端で二重鎖切断される。この切断には末端反復配列右半分は必要ない。T 3 ファージはゲノム DNA を左方向に詰め込むのでこの切断は終了切断に相当する。頭殻内への DNA 移送速度を低下させるとこの切断活性は高くなることから、headful mechanism とは頭殻内が DNA で満たされるにつれて DNA 移送速度が低下して標的配列の認識が可能となり、終了切断が起こるということかもしれない³³⁾。gp 19 分子に部位特異的変異を導入すると、gp 19 単独でもつ非特異的切断活性と同時に、詰込みに共役した特異的切断活性が失われることから、gp 19 は DNA 移送だけではなく、DNA 成熟機構にも中心的役割をもつと考えられる³⁴⁾。

欠失を導入した組換えプラスミド DNA を用いた形質導入実験により、T 3/T 7 の pac シグナルはコンカテマーからの切出しの標的配列である pacC とファージプロモーターのコンセンサス配列を含む pacB の 2 つの機能領域からなることがわかっている^{12,13)}。pacC は、さらに開始切断の標的配列である pacCR と終了切断の標的配列である pacCL よりなる。T 3 の詰込みでは、pacCR は詰込み開始に必要な DNA の自由端をつくるために必須であるが、pacCL は必須ではなく、頭殻内いっばいに詰め込んだときに pacCL が存在すれば正確に存在しなければ非特異的に終了切断が起こり詰込みが完了する¹³⁾。

pacB シグナルはファージプロモーターのコンセンサス配列とその下流に続く GA ストレッチからなる (図 3 B)。この領域から GA ストレッチを欠失するとプロモーター活性は低下しないが pacB 活性を失い、GA ストレッチをもたない後期プロモーター (ϕ 10) は pacB 活性をもたない。これらの事実は pacB 活性に GA ストレッチが重要であることを示す。pacB シグナル領域の

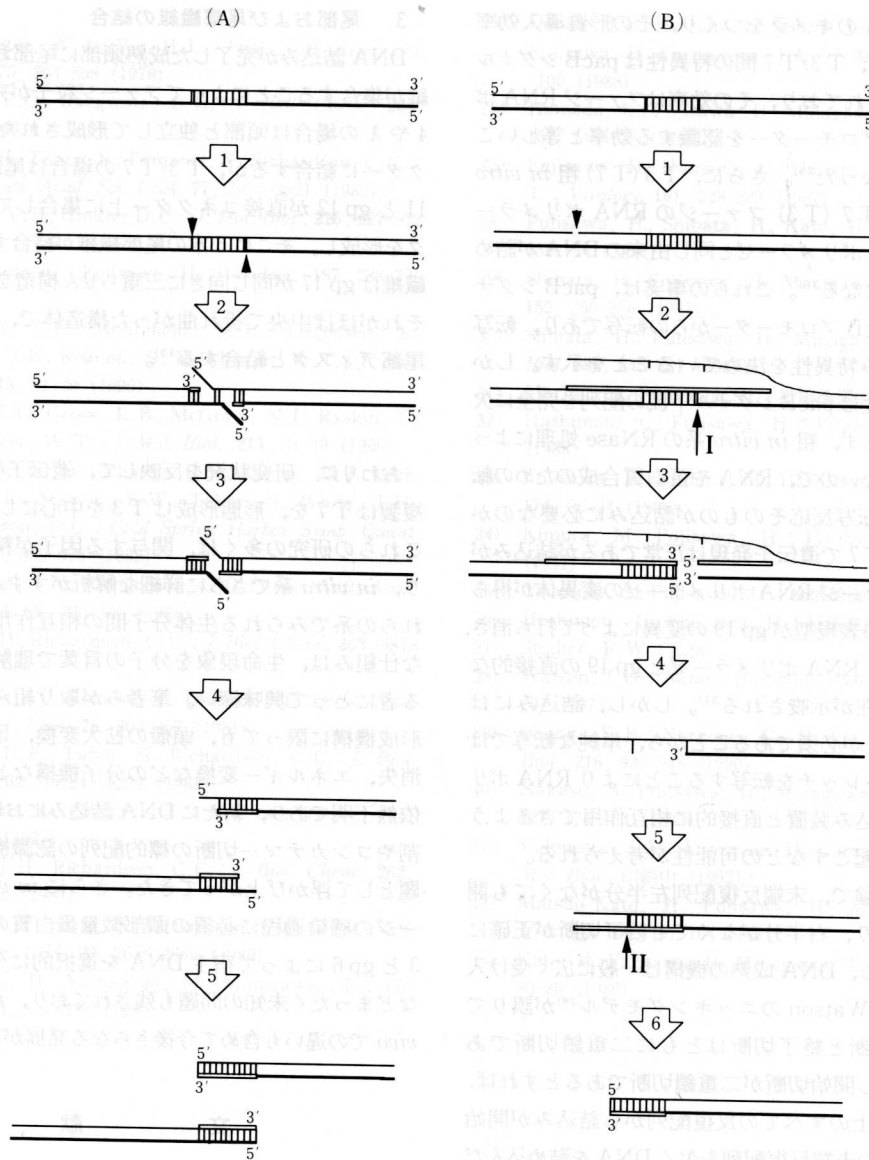


図 6. T3/T7 ファージの DNA 成熟機構

- (A) ニッキングモデル³⁸⁾: 末端反復配列の 5' 末端にニックが入り (1 段階), 生じた 3' 末端から DNA 合成を行なうことによって (2~5 段階), 2 つの分子を分けるとともに, 反復配列を複製する。
- (B) 二重鎖 DNA 切断モデル²²⁾: 末端反復配列の左側にニックが入り (1 段階), 生じた 3' 末端から DNA 合成が起こる (2 段階)。反復配列右端を二重鎖切断する (3 段階)。gp 6 によって DNA 断片を除去 (4 段階) したのち, 3' 末端から DNA 合成を行ない (5 段階), 反復配列左端で二重鎖切断して完了する (6 段階)。

矢じり印はニッキング, 矢印は二重鎖切断 (I は開始切断, II は終了切断), は新生 DNA。

プロモーター部分を段階的に欠失させるとプロモーター活性の低下に伴って pacB 活性が低下する¹³⁾。T3 の感染菌抽出液を硫酸分画し, 透析することで詰込みに

ヌクレオチドの添加を要求する粗 *in vitro* 系をつくることができる。この系による詰込みは 3' OH 基を欠くヌクレオチドアナログによって阻害される。T3/T7 間

で pac シグナルのキメラをつくり、その形質導入効率を調べたところ、T 3/T 7 間の特異性は pacB シグナルによって決定されており、その効率はファージ RNA ポリメラーゼがプロモーターを認識する効率と等しいことが明らかになった³⁵⁾。さらに、T 3 (T 7) 粗 *in vitro* 系にそれぞれ T 7 (T 3) ファージの RNA ポリメラーゼを加えると、ポリメラーゼと同じ由来の DNA が詰め込まれるようになる³⁶⁾。これらの事実は、pacB シグナルの機能は pacB プロモーターからの転写であり、転写特異性が詰込み特異性を決めていることを示す。しかし、詰込み活性は pacB シグナル下流の配列を完全に欠失しても失われず、粗 *in vitro* 系の RNase 処理によっても阻害されないで、RNA や蛋白質合成のための転写ではなく、転写反応そのものが詰込みに必要なかもしれない。T 7 で遺伝子発現は正常であるが詰込みが起らないファージ RNA ポリメラーゼの変異体が得られており、その表現型が gp 19 の変異によって打ち消されることから、RNA ポリメラーゼと gp 19 の直接的な相互作用の存在が示唆される³⁷⁾。しかし、詰込みには GA ストレッチが必須であることから、単純な転写ではなく、GA ストレッチを転写することにより RNA ポリメラーゼが詰込み装置と直接的に相互作用できるような構造変換を起こすなどの可能性が考えられる。

形質導入実験で、末端反復配列左半分がなくても開始切断が起こり、右半分がなくても終了切断が正確に起こることから、DNA 成熟の機構は一般に広く受け入れられている Watson のニッキングモデル³⁸⁾が誤りであり、開始切断と終了切断はともに二重鎖切断である^{22,33)}。しかし開始切断が二重鎖切断であるとするれば、コンカテマー上のすべての反復配列から詰込みが開始すると、左側の末端反復配列を欠く DNA を詰め込んだファージ粒子が生じるので、開始切断が反復配列の複製と共役する機構が存在すると考えられる。T 7 で、詰込みに先立って末端反復配列の近傍にニックが入り、そこから起こる DNA 合成によって反復配列が複製されるというモデルが提出されている^{22,39)}(図 6)、pacB シグナルは複製起点として働いて反復配列を複製する可能性もあり、今後の課題である。

終了切断によって生じた DNA 端がコネクターを通過すると、コネクターは構造変換を起こし、中央の穴が小さくなり DNA の飛出しが防がれるとともに、gp 19 が解離して、尾部蛋白質との結合能をもった成熟頭部となる^{40,41)}。

3. 尾部および尾部繊維の結合

DNA 詰込みが完了した成熟頭部に尾部および尾部繊維が集合することによってファージ粒子が完成する。T 4 や λ の場合は頭部と独立して形成された尾部がコネクターに結合するが、T 3/T 7 の場合は尾部蛋白質 gp 11 と gp 12 が直接コネクター上に集合して尾部ディスクを形成し、そこに 6 本の尾部繊維が結合する⁴²⁾。尾部繊維は gp 17 が同じ向きに三重らせん構造をとって延び、それがほぼ中央で折れ曲がった構造体で、N 末端側で尾部ディスクと結合する⁴³⁾。

おわりに 研究状況を反映して、遺伝子発現や DNA 複製は T 7 を、形態形成は T 3 を中心にして紹介した。これらの研究の多くは、関与する因子が精製されており、*in vitro* 系でさらに詳細な解析がすすんでいる。これらの系でみられる生体分子間の相互作用による巧妙な仕組みは、生命現象を分子の言葉で理解しようとする者にとって興味深い。筆者らが取り組んでいる頭部形成機構に限っても、頭殻の拡大変換、足場蛋白質の消失、エネルギー変換などの分子機構などについては依然不明であり、新たに DNA 詰込みにおける転写の役割やコンカテマー切断の標的配列の認識機構なども問題として浮かび上がってきた。さらに *in vivo* でのファージの感染過程に必須の頭部微量蛋白質の働きや、gp 3 と gp 6 によって宿主 DNA を選択的に分解する機構などまったく未知の問題も残されており、*in vitro* と *in vivo* での違いも含めて今後さらなる発展が期待される。

文 献

- 1) Fujisawa, H., Sugimoto, K.: *Virology*, **124**, 251-258 (1983)
- 2) Dunn, J.J., Studier, F.: *J. Mol. Biol.*, **166**, 477-535 (1983)
- 3) Studier, F., Dunn, J.J.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 999-1007 (1983)
- 4) Chamberlin, M., McGrath, J., Waskell, L.: *Nature (London)*, **228**, 227-231 (1970)
- 5) Matsuo, H., Fujisawa, H.: *Virology*, **54**, 305-312 (1973)
- 6) Dunn, J.J., Bauts, F.A., Bauts, E.K.P.: *Nature (London) New Biol.*, **230**, 94-96 (1971)
- 7) Yamagishi, M., Fujisawa, H., Minagawa, T.: *Virology*, **144**, 502-515 (1985)
- 8) Hesselback, B.A., Nakada, D.: *J. Virol.*, **24**, 736-745

- (1977)
- 9) McAllister, W.T., Wu, H.L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 804-808 (1978)
- 10) Olins, P.O., Rangwala, S.H. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 16973-16976 (1989)
- 11) Saito, H., Tabor, S., Tamanoi, F., Richardson, C.C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3917-3921 (1980)
- 12) Chung, Y.B., Hinkle, D.C. : *J. Mol. Biol.*, **216**, 927-938 (1990)
- 13) Hashimoto, C., Fujisawa, H. : *Virology*, **187**, 788-795 (1992)
- 14) Klement, J.F., Moorefield, M.B., Jergensen, E., Brown, J.E., Risman, S., McAllister, W.T. : *J. Mol. Biol.*, **215**, 21-29 (1990)
- 15) Joho, K.E., Gross, L.B., McGraw, N.I., Raskin, C., McAllister, W.T. : *J. Mol. Biol.*, **215**, 31-39 (1990)
- 16) Fuller, C.W., Beauchamp, B.B., Engler, M.J., Lechner, R.L., Matson, S.W., Tabor, S., White, J.H., Richardson, C.C. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 669-679 (1982)
- 17) Bernstein, J.A., Richardson, C.C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 396-400 (1988)
- 18) Nakai, H., Richardson, C.C. : *J. Biol. Chem.*, **263**, 9818-9830 (1988)
- 19) Fujiyama, A., Kohara, Y., Okazaki, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 903-907 (1981)
- 20) Huber, H.E., Tabor, S., Richardson, C.C. : *J. Biol. Chem.*, **262**, 16224-16232 (1987)
- 21) Shinozaki, K., Okazaki, T. : *Mol. Gen. Genet.*, **154**, 263-267 (1977)
- 22) White, J.H., Richardson, C.C. : *J. Biol. Chem.*, **262**, 8851-8860 (1987)
- 23) Tamanoi, F., Saito, H., Richardson, C.C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **22**, 2656-2660 (1980)
- 24) Fujisawa, H., Yamagishi, M., Minagawa, T. : *Virology*, **101**, 327-334 (1980)
- 25) Donate, J.E., Herranz, L., Secilla, J.P., Carazo, J.M., Fujisawa, H., Carrascosa, J.L. : *J. Mol. Biol.*, **201**, 91-100 (1988)
- 26) Hamada, K., Fujisawa, H., Minagawa, T. : *Virology*, **151**, 119-123 (1986)
- 27) Fujisawa, H., Hamada, K., Shibata, H., Minagawa, T. : *Virology*, **161**, 228-233 (1987)
- 28) Fujisawa, H., Shibata, H., Kato, H. : *Virology*, **185**, 788-794 (1991)
- 29) Shibata, H., Fujisawa, H., Minagawa, T. : *Virology*, **159**, 250-258 (1987)
- 30) Shibata, H., Fujisawa, H., Minagawa, T. : *J. Mol. Biol.*, **196**, 846-851 (1987)
- 31) Morita, M., Fujisawa, H. : 投稿準備中
- 32) Hashimoto, C., Fujisawa, H. : *Virology*, **166**, 432-439 (1988)
- 33) Fujisawa, H., Kimura, M., Hashimoto, C. : *Virology*, **174**, 26-34 (1990)
- 34) Kimura, M., Fujisawa, H. : *Virology*, **180**, 709-715 (1991)
- 35) Tsuchida, S., Fujisawa, H. : 投稿準備中
- 36) Hashimoto, C., Fujisawa, H. : 投稿準備中
- 37) Studier, F.W. : 私信
- 38) Watson, J.D. : *Nature (London) New Biol.*, **239**, 197-201 (1972)
- 39) Chung, Y.B., Nardone, C., Hinkle, D.C. : *J. Mol. Biol.*, **216**, 939-948 (1990)
- 40) Nakasu, S., Fujisawa, H., Minagawa, T. : *Virology*, **127**, 124-133 (1983)
- 41) Valpuesta, J.M., Fujisawa, H., Carrascosa, J.L. : *J. Mol. Biol.*, 印刷中 (1992)
- 42) Matsuo-Kato, H., Fujisawa, H., Minagawa, T. : *Virology*, **109**, 157-164 (1981)
- 43) Kato, H., Fujisawa, H., Minagawa, T. : *Virology*, **153**, 80-86 (1986)