φ X174DNA 複製とファージ粒子形成

University of California, San Diego 青山 明

In the late stage of infection, the morphogenetic reaction of bacteriophage φX174 is switched from DNA replication mode to phage formation mode by the function of φX174 gene C protein, gene J protein, and prohead. During the phage synthesis, structural changes of the capsid-related proteins occur. The gene B protein of prohead is cleaved at a specific site by a novel protease which has been isolated from the outer membrane of *Escherichia coli* cells. Cross-linking experiments indicate that the rearrangement of gene F major coat proteins occurs during DNA packaging.

DNA replication / DNA packaging / phage maturation

ウイルスの増殖過程には、一連の蛋白-蛋白および蛋白-核酸相互作用が含まれている。筆者等は、ウイルスの一種であるバクテリオ・ファージ φ X174を用いて、ウイルスの増殖機構に含まれるこれらの一連の相互作用を、主に *in vitro* の系で研究している。

φ X174の利点は、それが十分単純な系であり、そこに関与しているすべての要素を全体との係わりの中で個別的に研究出来ると共に、十分複雑な系でもあり、従ってそこに種々の生物学的に重要な反応が含まれていることである。それに加えて、多くの近縁種があり、それらの比較研究が直接分子レベルで可能な点である。筆者等の研究室では、φ X174のDNA合成とファージ粒子形成反応を *in vitro* で精製した酵素のみで再構成することに成功し¹⁾、これらの反応にかかわっている蛋白質の相互作用を系全体の機能との関連において研究できるようになった。この小論ではこれらの蛋白質間相互作用について述べてみたい。

A. φ X174のライフ・サイクル^{2),3)}

φ X174は大腸菌 *Escherichia coli* を宿主として増殖するウイルスで、環状の一本鎖 (single-stranded, ss) DNA と、それを包む正十二面体の蛋白質の殻からなっている。φ X174の遺伝子の機能とライフサイクルの大略は、*in vivo* 及び *in vitro* の研究によって明らかにされており、表1と図1に示しておいた。φ X174のゲノムは感染後まず二本鎖 (double-stranded, ds) の複製型 (replicative form, RF) DNA

に変換され (stage I), このRFDNAが半保存的に複製される (stage II). 感染後期になると、半保存的RF DNA複製が停止し、ウイルス鎖の特異的合成が開始する。 (Stage III). このウイルス鎖の合成は、50S複合体と呼ばれる特異的な、DNA-蛋白複合体中で、ウイルス殻内へのDNAパッケージングと共役して進行する。これら三段階にわたるDNA合成反応の詳細はすでにいくつかの総説^{3,4)}で述べてあるので、以下に、stage IIとIIIについて簡単に述べるにとどめる。

Stage II DNA合成は、φ X174のA蛋白が、RF DNAのori⁺でウイルス鎖を切断することにより始まる (図2)。A蛋白は、切断されたウイルス鎖の5'-末端に共有結合することにより、RF-A蛋白複合体を形成する。DNA複製反応は、このRF-A蛋白複合体上での、ローリング・サークル型ウイルス鎖合成と、RF DNAからほどかれたウイルス鎖を鋳型とした相補鎖の合成が共役して進行する。このstage IIでの相補鎖の合成は、基本的にstage Iと同じ反応機構によって進行する。一方、ウイルス鎖のローリング・サークル型合成には、*E. coli*のrep蛋白、DNAポリメラーゼ III・ホロ酵素 (以下、ホロ酵素と呼ぶ)、及び、SSB (single-stranded DNA binding protein)が必要である。rep蛋白は、RF-A蛋白複合体中のA蛋白と結合し、ATPの加水分解エネルギーによって、ウイルス鎖と相補鎖をほどいてゆく。ほどかれた一本鎖DNAは、SSBの結合によって安定化する。ウイルス鎖の合成は、RF DNAのウイルス鎖3'-末端をプライマーとして、ホロ酵素によって行われる。

stage III DNA合成は、φ X174のA蛋白、C蛋白、J蛋白、プロヘッド (ファージ殻前駆体で、ファージ構

φX174 DNA replication and Phage Morphogenesis

Akira AOYAMA

University of California, San Diego

表 1. Genes of φ X174

gene		DNA replication stages blocked by mutation	mol. wt. of gp in PAGE (daltons)	mol. wt. of gp from sequence (daltons)
A	Stg. II, Stg. III	RF→RF, RF→SS	60,000	58,650
A*	shut off host DNA repl.	unknown	37,000	38,700
B	morphogenesis, Ω	RF→SS	20,000	13,830
C	switch Stg. II to Stg. III	RF→SS ^c	5,800	10,050
D	morphogenesis, Ω, 132S comp.	RF→SS	14,000	16,920
E	lysis	none	10,000	10,370
F	major capsid protein, Ω	RF→SS	50,000	48,440
G	major spike protein, Ω	RF→SS	20,000	19,020
H	minor spike protein, Ω, adsorption	RF→stable SS	37,000	34,370
J	phage internal protein, Stg. III	RF→stable SS	4,050	4,220
K	stimulation of phage synthesis	none	8,000	6,380

Abbreviations : comp, component, replication ; Stg. II and Stg. III, Stage II and Stage III
DNA replication ; Ω, Prohead component

図 1. φ X174のライフ・サイクル

φ X174の感染は、一本鎖 DNA が大腸菌内に進入し細胞膜に付着することにより始まる。感染初期には、まず一本鎖 DNA が宿主の DNA 合成酵素群によって二本鎖の複製型 (RF) DNA に変換され (Stage I), 次にこの RF DNA の半保存的複製によって数十分子の RF DNA が合成される (Stage II)。一方では、RF DNA を鋳型として φ X174の遺伝子の転写がおこり、φ X174特異的蛋白が合成される。これらのうち、F, G, H, B 及び D 蛋白からウイルス殻前駆体であるプロヘッドが形成される。感染後期には、プロヘッドが RF DNA に結合し、50 S 複合体が形成される。この複合体中で、ローリング・サークル型のウイルス鎖合成と、プロヘッド内へのウイルス鎖のパッケージングが共役して起こる。その結果、感染性をもったファージ粒子 (132S) が形成され、この粒子は、生理的イオン強度下では、114S の成熟ファージ粒子に変わる。

造蛋白 F, G, H と、非構造蛋白 B 及び D からなる), *E. coli* の *rep* 蛋白及びホロ酵素を要求する (図 1, 2). ウイルス鎖の合成は, RF-A 蛋白複合体形成によって開始し, ローリング・サークル型 DNA 合成によって進行する. この反応は, RF-A 蛋白複合体に, プロヘッド及びその他の酵素類が結合した 50 S 複合体中でおこり, ほどかれたウイルス鎖は, 直接プロヘッド内部にとり込まれる. このようにして, 一回転のローリング・サークル型 DNA 合成毎に, 一ウイルス粒子が形成される.

B. DNA 複製からウイルス粒子形成反応へのスイッチ機構

前節で述べたように, stage II と III の DNA 合成反応は, *in vitro* の系で個別によく研究されている. しかし, 実際の感染菌内では, stage II から III への DNA 合成様式の変換がおこなわれる. この変換は, これら両 DNA 合成反応が, 同じ RF-A 蛋白複合体を用いているので, 一連の複雑な蛋白間あるいは蛋白-DNA 間の相互作用を含んでいることが予想される. この変換は, stage II DNA 合成反応の停止と, stage III DNA 合成反応の開始という二反応からなることが *in vivo* の実験で示されている. 筆者等は, *in vitro* の stage II から III への変換系を用いて, この二種の反応が直接関連していることを示し, 変換の基本的機構を明らかにした⁵⁾ (図 2).

Stage II DNA 複製から stage III ウイルス粒子形成反応へのスイッチには, ϕ X174 の C 蛋白が本質的役割を荷っている. C 蛋白は, SSDNA 結合蛋白であるが, stage II DNA 合成開始複合体に特異的に結合する能力をもつ. この結合は, stage II DNA 合成開始複合体中で, *rep* 蛋白によって部分的にほどかれた一本鎖部位で起こると考えられ, SSB と拮抗的に起こる. この結果生じた C 蛋白-DNA 合成開始複合体は, このままでは DNA 合成能を持たない. このように C 蛋白は stage II DNA 合成を, その開始時において, SSB に対して拮抗的に阻害する. C 蛋白による stage II DNA 合成の阻害の特徴は, 一担 stage II DNA 合成が, SSB によって進行し始めると, それを停めることが出来ない点にある. 言い方を変えると, C 蛋白は, stage II DNA 合成の開始を阻害するが, DNA 鎖の伸長は阻害しない. この阻害様式は, DNA 合成様式のスイッチ機構にとって本質的に重要な点であり, 感染後期, C 蛋白の濃度が上昇するにつれて, すべての stage II DNA 合成の反応中間体は, 数回転のローリ

図 2. Stage II 及び Stage III DNA 合成の機構

Stage II DNA 合成は, ϕ X174A 蛋白が, 分子内によれを持つ RF DNA (RF I) のウイルス鎖を特異的箇所 (*ori*⁺) で切断することによって始まる. A 蛋白は, この切断によって生じたウイルス鎖の 5'-末端に共有結合し, その結果, ねじれをもたない RF (RF II)-A 蛋白複合体が形成される. この RF II-A 蛋白複合体が, Stage II 及び Stage III の両 DNA 合成反応に用いられる. Stage II における相補鎖の合成は, ウイルス鎖合成の途上 (図には示していない) あるいは終了後に, Stage I と本質的に同じ機構で合成される.

ング・サークル型複製を完了した後, 特異的な C 蛋白-DNA 合成開始複合体に変換される. ウイルス鎖の合成は, この C 蛋白-DNA 合成開始複合体を, プロヘッドが特異的に認識し結合することによって再開する. このように, stage II DNA 複製から stage III ウイルス粒子形成へのスイッチは, SSB, C 蛋白およびプロヘッドの量比とそれぞれの蛋白の特異的な性質によって決定される.

C. DNA パッケージング

ウイルス殻内への DNA パッケージングは, ウイルス粒子形成反応のハイライトの一つであるにもかかわらず, その機構の本質は, よくわかっていない. 先に述べたように ϕ X174 では, 50 S 複合体中で, ローリング・サークル型 DNA 合成によって RF DNA から分離されたウイルス鎖が, 直接プロヘッド内にパッケージされる. この反応には, ϕ X174 の J 蛋白が必須である. J 蛋白はウイルス粒子の構成蛋白であるが, 他の構成蛋白とは異なり, プロヘッド中にはなく, DNA パッケージング反応と共にウイルス殻内に入る. J 蛋白が存在しない場合, 50 S 複合体中で, ローリング・サークル型 DNA 合成は通常と変わりなく進行す

るが、ウイルス鎖は、プロヘッド中にパッケージされることなく外部にとどまる。その結果、*in vitro* では、環状一本鎖 DNA が遊離した形で合成され⁶⁾、また *in vivo* では、これら一本鎖 DNA は、ヌクレアーゼによって速かに分解される⁷⁾。

J 蛋白は、37 アミノ酸残基からなる極めて塩基性の強い蛋白で、ウイルス殻内で直接 DNA を濃縮すると考えられている。最近のレーザー・ラマン法によるファージ粒子の解析⁸⁾によると、粒子内の DNA 構造は、B 型の ds DNA 型ではなく、熱変性した DNA に類似しており、塩基間相互作用は少数に限られている。これは SSRNA 植物ウイルスや RNA ファージに見られる ds A 型 RNA の二次構造とも対照的である。これらのことは、φ X174 粒子内では、SSDNA と蛋白の相互作用によって、DNA の殻内形態が決定されていることを示唆されている。

J 蛋白は、DNA および RNA に、ds あるいは SS にかかわらず結合する。この結合は共同的であり、また、ある一定の J 蛋白と DNA の濃度比を超えると、J 蛋白 - DNA 複合体のアグリゲートが形成され、溶液から沈殿する。電子顕微鏡による観察から、J 蛋白 - DNA 複合体は特異的なコンパクトな形態をとっていることが示唆されている⁹⁾。この J 蛋白 - DNA 複合体形成は、塩によって阻害されることから、静電的性質をもつことが示唆される。一般に、ポリアミン等 3 価以上の陽イオン存在下では、DNA の濃縮がおこり¹⁰⁾、スベルミジン (3+) やスベルミン (4+) の存在下では、協同的分子内濃縮がおこって、ドーナツ状のコンパクトな DNA の形態が生じることが知られている¹¹⁾。ポリ陽イオンである J 蛋白による DNA 濃縮機構にもポリアミンの作用と似た反応が関与していることが予想される。しかし、スベルミジン等ポリアミンは、*in vitro* で、J 蛋白のかわりをつとめることは出来ず⁶⁾、J 蛋白依存の DNA 濃縮には他の因子、例えば、蛋白間相互作用等、が関与していると考えられる。

以上に述べたように、J 蛋白と DNA 相互作用は、DNA パッケージングの理解にとって重要であるので、J 蛋白 - DNA 複合体の構造解析は有用な知見をもた

らすと考えられる。図 3 に種々のファージからの J 蛋白及び *in vitro* で構築したフレーム・シフト・変異体である *ins J*⁷⁾ とその復帰変異体⁷⁾ のアミノ酸配列を示してある。生物学的活性のある J 蛋白に共通なものは、N-末端側のアルギニンとリジンに富んだ塩基性部位と、C-末端側の高度に保存された芳香族アミノ酸を含む疎水基部位である。*ins J* では、疎水部のアミノ酸配列が異なっており、このことからこの部位の生物活性における重要性が示唆される。現在、私達の研究室で、これら一次構造における活性ドメインの同定と共に、J 蛋白及び J 蛋白 - DNA 複合体の三次元構造の解析を進めている。三次元構造の解析には、結晶の X 線回析法と共に、最近急速に発展して来ている二次元核磁気共鳴法 (2D-NMR)¹²⁾ による解析の両法を用いた共同研究を進めている。特に 2D-NMR 法は、蛋白の水溶液中での構造解析であるので、標品作成が容易であるばかりでなく、変異体の変異部位や DNA との相互作用の研究にとって有用な手段となつて来ている。しかし、2D-NMR 法においては、蛋白の各スピン系の同定とその相対的空間配置の決定が不可欠であり、この点で、解析可能な蛋白の分子量に制限がある。J 蛋白は極めて小さい蛋白であり、この点で 2D-NMR 解析に特に適している。

D. ファージ粒子形成

ファージ粒子は、DNA と J 蛋白がプロヘッドに取り込まれることによって形成される。この反応中に、プロヘッドはその組成と構造を大きく変え、感染性をもったファージ粒子となる。そこでここでは、プロヘッドの組成変化と構造変化に関する最近の知見をまとめてみる。

プロヘッドは、ファージの構造蛋白である F 蛋白 (主コート蛋白)、G 蛋白 (スパイク蛋白)、H 蛋白 (スパイクチップ蛋白) と、足場蛋白と考えられている B 蛋白及び D 蛋白からなり、組成では、F₆₀G₆₀H₁₂B₆₀D₂₄₀ である。その三次元構造はわかっていないが、ファージ粒子様構造を D 蛋白が包んだ形を

	1									10									20	
φ X174	ser	lys	gly	lys	lys	arg	ser	gly	ala	arg	pro	gly	arg	pro	gln	pro	leu	arg	gly	thr
G4	*	*	*	*	*	lys	lys	lys	ile	arg	ser	gly	*	*	*	*	*	*	*	*
insJ	ser	lys	gly	lys	lys	arg	ser	gly	ala	arg	pro	gly	arg	pro	gln	pro	leu	arg	gly	asp
revertant	ser	lys	gly	lys	lys	arg	ser	gly	ala	arg	pro	gly	arg	pro	gln	pro	leu	arg	gly	thr

図 3.

っていると考えられている。プロヘッドはこのように大きな構造体であるが、その機能も多様であり、C 蛋白-DNA 合成開始複合体との特異的結合、この C 蛋白-DNA 合成開始複合体上での DNA 合成の開始、DNA 及び J 蛋白の受け入れ、及びファージ粒子への成熟、等の機能をもつ。これらの機能の遂行にあたり、ファージ粒子形成のある時期に、足場蛋白の一つである B 蛋白がプロヘッドからのぞかれる。この反応の生物学的意義及び機構はまだ不明だが、その両者の解析にとって有用な一つの知見が最近得られた。それは B 蛋白がプロテアーゼによって特異的に分解されるということである¹³⁾。

B 蛋白は、120 アミノ酸残基からなり、F 蛋白と G 蛋白から F 蛋白-G 蛋白複合体を形成するのに必要であり、プロヘッド形成過程に関与している。最近になって、プロヘッド中にプロテアーゼが存在或いは混入しておりプロヘッドを *in vitro* で保温することによって、B 蛋白が特異的に分解されることがわかった。このプロテアーゼ反応は特異的であり、アミノ酸 76 と 77 (アルギニン-アルギニン) の間で B 蛋白を二本のポリペプチドに切断する。このプロテアーゼは、*E. coli* の外膜に局在する膜蛋白であり、種々の阻害剤を用いた研究から、今までに報告されていない新しいプロテアーゼであることが示唆される。B 蛋白の半減期が *in vivo* で著しく短く、新しく合成された B 蛋白は速かに分解消化されることは以前から知られていた。上に述べたプロテアーゼによる B 蛋白の特異的切断が、それに続く B 蛋白フラグメントの分解消化を誘発するものと思われる。実際、B 蛋白フラグメントの一方は、*E. coli* 細胞質の抽出液中で消化されることがわかっている。外膜からの特異的プロテアーゼの分離精製によって、今後、B 蛋白のプロヘッドからの遊離の生物学的意義およびその機構の解析が発展するものと思われる。

プロヘッドからファージ粒子への成熟に伴う構造変化の解析は、その機構の解明という点からのみならず、構造的にも機能的にも全く異なったこれら二種の構造体の生物学的機能の解明にとっても重要である。私達の研究室で最近行った蛋白-蛋白クロスリンク法によるプロヘッドとファージ粒子の構造比較によると、主コート蛋白である F 蛋白の両構造体中での存在様式に大きな違いがあることが示唆された¹⁴⁾。F 蛋白は 5 量体をつくる性質があり、この 5 量体が正二十面体のファージ粒子の 12 の角を形成すると考えられている。

これを支持するように、ファージ粒子のクロスリンクからは、F 蛋白の 1 量体から 5 量体までのクロスリンク産物が得られる。これに対し、プロヘッドでは、1 量体から 3 量体までの F 蛋白産物しか得られない。このことから、プロヘッド内では、ファージ構成蛋白は、ファージ粒子内のそれらとは異なった集合状態をもっていると考えられる。

E. プロヘッドの調節機能

一つの生物系を研究する場合、そこに含まれている各々の生化学的反應の機構を切り離して研究するだけでなく、系の全体性を保つ調節機構の理解も重要である。ここでは、すでに幾人かの人達が指摘している一つの問題¹⁵⁾について考えてみたい。それは、この稿で述べたように、J 蛋白が ds, SS にかかわりなく DNA あるいは RNA に結合し、濃縮する機能をもつなら、何故、DNA 複製あるいはファージ形成の鑄型である RF DNA を濃縮し、これらの反応を阻害しないのか、という問題である。実際、J 蛋白を、*in vitro* の stage II DNA 複製系に加えると、DNA 鎖の伸長をとめることによって阻害する。このことは、DNA 複製、ファージ形成のみに有害であるだけでなく、DNA 複製からファージ形成への C 蛋白によるスイッチにも有害である。それは、C 蛋白が、DNA 複製開始複合体と特異的に相互作用するためには、常に DNA 複製反応がアクティブである必要があるからである。これら J 蛋白と DNA の相互作用の特異性によって生じる諸問題は、プロヘッドの機能によって解決されるらしいことが、最近、*in vitro* の研究でわかって来た¹⁶⁾。In vitro の実験によると、プロヘッドの存在下では、J 蛋白は DNA と直接強い相互作用を行なえず、従って DNA の濃縮も観察されない。さらに *in vitro* のファージ合成系に於ける J 蛋白の量はプロヘッドの量と化学量論的關係にあることがわかっている。これらのことから、プロヘッドは、J 蛋白と相互作用することにより、RF DNA の濃縮、DNA 複製やファージ粒子形成反応等の阻害などをふせぎ、ファージ粒子形成という系全体の機能のための調節機能をはたしていることがわかる。

F. おわりに

以上述べて来たように、*in vitro* の系を用いたウイルス増殖機構の研究によって、その中に含まれる各々の反応過程の理解が深まると共に、プロヘッドによるファージ粒子形成反応系の調整等、今までに知られて

いなかった蛋白間の相互作用も明らかになって来た。今後は、これら複雑な蛋白-蛋白あるいは蛋白-核酸相互作用の機構を、蛋白の三次元構造と関連付けて研究してゆくことが必要であろう。特に φ X174増殖系では、それに関与するほぼすべての蛋白が精製され、それらの相互作用がよく研究されているので、これらすべての蛋白の三次構造の決定が望まれる。

文 献

- 1) Aoyama, A., Hamatake, R. K., Hayashi, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4195-4199.
- 2) Hayashi, M. (1978) The single-stranded DNA phages, (Denhardt, D. T., Dressler, D. Ray, D. S., eds.) 531-547.
- 3) Hayashi, M., Aoyama, A., Richardson, Jr., D. L., Hayashi, M. N. (1987) Bacteriophages (Calndar, R., ed.) Plenum, New York.
- 4) 青山 明 (1984) 細胞工学, **3**, 815-824
- 5) Aoyama, A., Hayashi, M. (1986) *Cell*, **47**, 99-106.
- 6) Hamatake, R. K., Aoyama, A., Hayashi, M. (1985) *J. Virol.*, **54**, 345-350.
- 7) Hamatake, R. K., Buckley, K. J., Hayashi, M. (1988) *Mol. Gen. Genet.*, **211**, 72-77.
- 8) Incardona, N. L., Prescott, B., Sargent, D., Lamba, O. P., Thomas, Jr., G. J. (1987) *Biochemistry*, **26**, 1532-1537.
- 9) Geiduschek, J., Aoyama, A., Hayshi, M. 投稿準備中
- 10) Widom, J., Baldwin, R. L. (1980) *J. Mol. Biol.*, **144**, 431-453.
- 11) Chattoraj, D. K., Gosule, L. C., Schellman, J. A. (1978) *J. Mol. Biol.*, **121**, 327-337.
- 12) Wuthrich, K. (1986) NMR of proteins and nucleic acids, John Wiley and Sons, New York.
- 13) Richardson, Jr. D. L., Aoyama, A., Hayashi, M. 投稿準備中
- 14) Dalphin, M., Aoyama, A., Hayashi, M. 投稿準備中
- 15) Casjens, S. (1985) Virus structure and assembly, (Casjens, S., ed.) 75-147.
- 16) Aoyama, A., Dalphin, M., Hayashi, M. 投稿準備中

あおやま あきら

1979年大阪大学理学研究科で学位取得後、U. C. San Diego の林多紀教授の下で φ X174の研究を始め現在に至っています。絵を描くことが好きで、研究も絵画の如く常に系全体のバランスが気になる由縁です。最近蛋白の適応進化に興味をもち、研究の対象を有核細胞を含んだより一般的な宿主と病原因子との相互作用に広げると共に蛋白の構造研究にも力を注ごうと思っています。

Department of Biology, B-022, University of California,
San Diego, La Jolla, CA. 92093.

☎619-534-2461