



T4 ファージの謎を追い求めて

有坂 文雄 研究室～分子生命科学専攻



有坂 文雄 教授



T4 ファージとは

ウイルスは普通の生物とは異なり、細胞に感染することで増殖する。その中でも T4 ファージと呼ばれるウイルスは、大腸菌に自分の DNA を注入することで感染する。感染を受けた大腸菌の内部では子ファージが大量に増殖し、大腸菌を内側から溶かして出てくる。

T4 ファージはタンパク質と核酸からなり、複雑な構造をもっている。T4 ファージは大まかに頭部、尾部、尾繊維の三つの部分に分けられる(図1)。頭部は、構造を安定化させる2種類のタンパク質と、骨格を形作る2種類のタンパク質によって構成された球殻構造からなる。球殻構造の中には、頭部の約600倍の長さのDNAが、モータータンパク質と呼ばれるタンパク質によって挿入され、収納されている。ネック部分には、6本のひげが生えている。尾部は、細長く収縮することができる二重円筒構造の部分と、15種類のタンパク質からなる基盤の部分で構成されている。基盤下部には小尾繊維が折りたたまれており、感染時には下向きに飛び出す(図2)。尾部の長さは、物差しタンパク質と呼ばれるタンパク質によって厳密に制御されており、同種のどのファージ間でも

大腸菌に感染する T4 ファージというウイルスがある。T4 ファージの構造は複雑で、解析も完了しておらず、感染機構や形成機構においても解明されていない謎が未だ数多く残っている。有坂研究室では、さまざまな手法を用いてこれらの謎を解明しようとしている。

本稿の執筆にあたり有坂先生から、現在行っている T4 ファージの構造解析、感染機構や形成機構の解明の手法、加えて先生たちの代表的な研究手法である超遠心分析と、超遠心分析機を用いた研究について、お話を伺った。

も正確に等しい。尾繊維は、4種類のタンパク質からなり、尾部基盤から突き出した繊維状構造をもち、くの字形に屈曲している。

感染を受ける大腸菌の表面では、T4 ファージの尾繊維の先端が大腸菌の受容体と弱く結合したあと、小尾繊維が基盤下部から飛び出してきて、

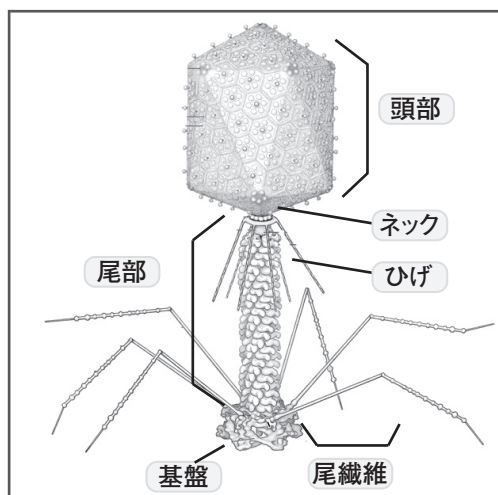
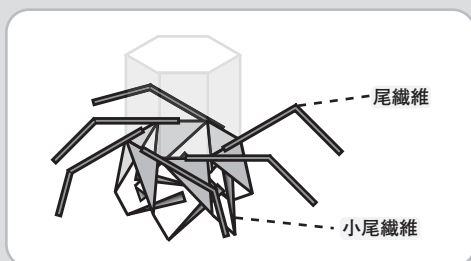
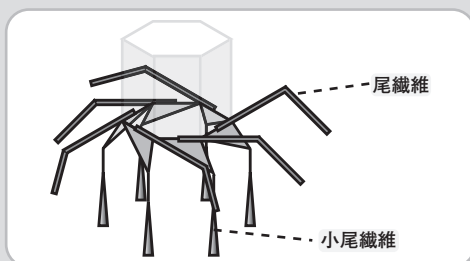


図1 T4 ファージの形状

大腸菌に吸着する前の基盤



大腸菌に吸着した後の基盤



感染前はT4ファージの小尾繊維は基盤下部に折りたたまれているのだが、感染時に小尾繊維が突き出して大腸菌に結合する。

図2 基盤の感染時における構造変化

大腸菌の表面と強く結合する(図3 A)。表面と結合すると、二重円筒構造の外筒が収縮し、それに伴って内筒である尾管が下の方に突き出る。尾管の先にはテイルリゾチームと呼ばれるタンパク質があり、これを大腸菌の外膜に突き刺すことによって穴を開ける(図3 B)。この穴から尾管を挿し込み、それを通して自身のDNAを大腸菌内部

に注入する(図3 C)。

有坂先生は、大腸菌への感染過程における T4 ファージの構造変化の機構や、T4 ファージの形成機構を明らかにしようとしている。本稿では、先生の T4 ファージに関する研究と、研究に多く用いられている超遠心分析機、それに関連したタンパク質製剤の研究について紹介する。

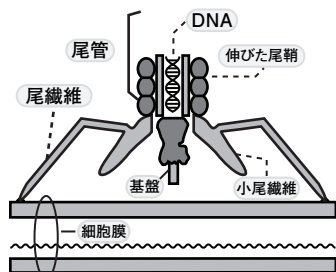


図3A.大腸菌の表面と結合する

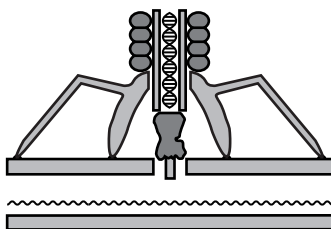


図3B.大腸菌の外膜に穴を開ける

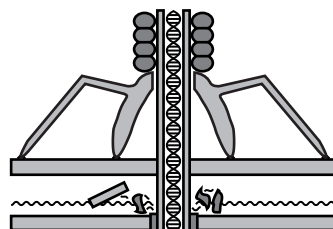


図3C.DNAを放出する

図3 DNA の注入



ミクロの世界の構造解析

先生たちは、二つの手法を組み合わせることによって、ファージの基盤の構造を原子レベルで解明することに成功した。具体的には、電子顕微鏡からの三次元像再構成で基盤の大まかな構造を、X線結晶解析で基盤を構成するタンパク質の精密な立体構造をそれぞれ調べ、組み合わせることで解明した。

電子顕微鏡からの三次元像再構成は、まずさまざまな角度から数千個に及ぶファージの電子顕微鏡像を撮る。次に、そのデータを元にしてコン

ピュータで処理することで、二次元のデータから、三次元のデータである対象物全体のタンパク質の立体配置を求める。

電子顕微鏡からの三次元像再構成では、対象全体の立体構造データが得られるが、分解能が低く、原子レベルでの解析は行えない。分解能とは、対象を見るスケールの限界のことである。この手法では、ファージの溶液を瞬時に凍結した試料を用いている。このとき、試料は電子線によって容易にダメージを受けるため、焦点を合わせたら視野

をすぐにずらして、撮影対象が電子線によってダメージを受ける前に素早く撮影するという工夫が必要になる(図4)。

X線結晶構造解析は、まず結晶にX線を当てることで回折させ、X線の回折した位置、回折した方向、強度などを求める。次に、それらの情報をもとに、結晶の構成原子の種類と配置を割り出す。生化学の分野では、タンパク質の立体構造を原子レベルで解析するためによく使われている。

X線結晶構造解析では、対象のタンパク質複合体が極端に大きくなければ、構造を原子レベルで解析することができるが、対象物がファージのように大きいと、一度に全体の構造を得ることはできない。結晶化したファージは、単位格子に含まれている原子の数が膨大になるため、解析を行うことが困難だからである。また、ファージのように巨大で非対称なタンパク質の集合体は結晶化が難しいことも、X線結晶構造解析を利用することの大きな障害となっている。

ファージを構成するタンパク質をX線結晶構造解析で解析できる大きさで得るためには、ファージを解体する方法が考えられる。しかし、タンパク質は互いに強く結合しているので、解体によってタンパク質が変性してしまいファージ中のタンパク質と同じ構造のものを得ることは難しい。そこで、ファージ中のタンパク質の構造をX線結晶構造解析で調べるためには、ファージの遺伝情報をもとにして人工的にタンパク質を合成する必要がある。合成した個々のタンパク質のX線結晶構造解析を行うことで、それらの構造の原子レベルのデータを得ることができる。

先生たちは、米国の共同研究者と協力して、三次元像再構成で得られた分解能の低い立体像に、X線結晶構造解析で得たタンパク質の分解能の高いデータをあてはめていった。それぞれの手法だけではうまくいかなかったものが、二つの手法を組み合わせることで、T4 ファージの基盤の構造を原子レベルで解析することを可能にしたのだ。そして先生たちは、T4 ファージの構造が感染過程においてどのように変化しているのかを明らかにした。先生たちは、感染前後の基盤を比較することで、T4 ファージの基盤を構成する一つ一つのタンパク質の構造自体は大きな変化をしておらず、タンパク質同士の相対的な位置、すなわち四

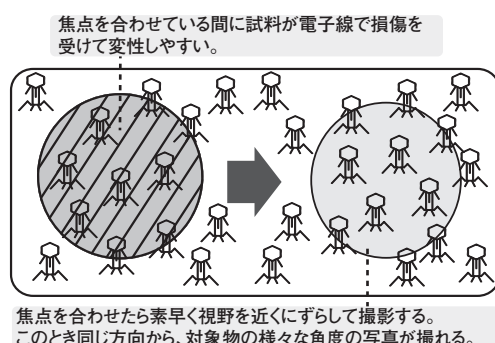


図4 三次元像再構成における写真の撮り方
次構造が変化していることを明らかにした。

また先生たちは、なぜT4 ファージが複雑な構造をもつように進化したのかを知るために、類縁のファージを調べてきた。テイルリゾチームの構造に似たタンパク質をT4 類縁ファージ以外には発見できなかったが、大腸菌の毒素を分泌する装置の構造がテイルリゾチームの構造とよく似ていることも明らかにした。

大腸菌とファージが似た構造の部分をもつ理由として、ファージが細菌から遺伝子を受け取って性質が変化したと先生は考えている。細菌がファージから別の細菌の遺伝子を受け取って性質が変化することがよくあり、ファージが細菌から遺伝子を受け取って変化することも起こりうると思われる。具体的には、ファージが進化する過程で大腸菌の毒素分泌装置がファージの一部として取り入れられたと考えているのである。以上のことから先生は、ファージには自然界において細菌間での遺伝子の受け渡しを仲介する働きがあり、細胞分裂でしか増えることのできない細菌に生物としての多様性をもたらす要因の一つになっているのではないかと推測している。

先生は、T4 ファージの構造変化の機構を詳しく解明することで、T4 ファージの性質を模倣した分子素子の作成が可能になると考えている。分子素子とは、分子単位で固有の機能をもつ分子のことである。作成できそうなもの具体例として、生体内で目的の器官に到達したところでDNAや薬剤を速やかに注入する分子素子や、タンパク質重合体の長さを自由に制御できる物差しタンパク質に似た働きをもつ分子素子が挙げられる。T4 ファージの研究が進めば、こうした分子素子を作成する可能性がより開かれていくだろう。



自己組織化のしくみ

T4 ファージは、自身の構造を自己組織化によって形成している。自己組織化とは、外部からエネルギーを与えなくても、熱力学的な安定性に従って自動的に組織が形成されていくことである。T4 ファージの自己組織化は遺伝子によってではなく、タンパク質間の分子間相互作用により制御されている。遺伝子が制御するのは生成するタンパク質の種類であり、形成機構ではない。タンパク質は常にブラウン運動をしており、これによって特定のタンパク質同士が接触するとタンパク質同士がお互いを認識して結合する。極端に言えば、特定のタンパク質を試験管に入れてかき混ぜるだけで複合体が形成される。

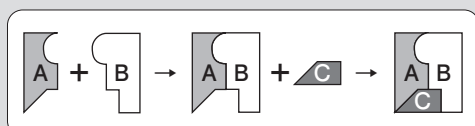
T4 ファージの自己組織化は非常に秩序立った経路に沿って行われている。例えば、尾部基盤の周辺部を構成するウェッジという構造の形成において、これに含まれるタンパク質の結合順序は厳密に決まっている。この機構について、二つの仮説が立てられていた。3種類のタンパク質 A,B,C が結合する機構において、A と B が結合して初めて C が結合するという機構を考える。一つ目の仮説はジグソーモデル(図5 A)と呼ばれている。これは、タンパク質 A とタンパク質 B がそれぞれの構造を変化させることなく結合しその境目にちょうど別のタンパク質 C が結合できるよ

うになっているという仮説である。二つ目の仮説はインデューストフィットモデル(図5 B)と呼ばれている。これは、タンパク質 A とタンパク質 B が結合することによってタンパク質 A + B の構造が変化して、別のタンパク質 C と結合できるようになるという仮説である。

有坂研究室では、この二つの仮説のうち、インデューストフィットモデルが正しいという結論を出した。先生は、T4 ファージを構成するタンパク質をさまざまな組み合わせで混合して、結合の強さを調べた。ファージを構成する多数のタンパク質の中で、順番に結合するタンパク質の四つをそれぞれ α , β , γ , δ と表すことにする。このとき、 γ , δ はいずれも β と弱いながらも結合した。しかし、 β は事前に α と結合していると、 δ とは全く結合しなくなり、 γ のみと強く結合するようになった。そしてこの時、 γ と結合することで δ が強く結合するようになった(図6)。この実験結果は、ウェッジの形成にインデューストフィットモデルが当てはまることを強く示唆している。

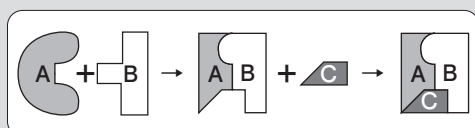
現在、先生は T4 ファージの自己組織化についての速度論を研究している。具体的には、各タンパク質を混合した時、どの程度速く平衡に達するかを調べて速度定数を求めている。先生は、さまざまな視点から T4 ファージの自己組織化の謎を解き明かしていこうとしているのだ。

(A) ジグソーモデル



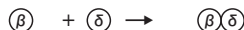
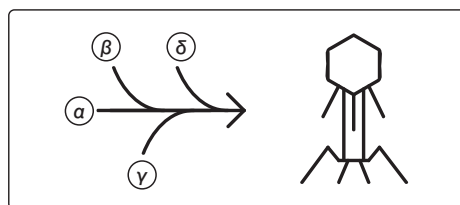
タンパク質 A と B が結合してできた境目に別のタンパク質 C が結合する

(B) インデューストフィットモデル

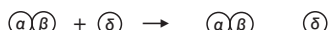


タンパク質 A と B が結合することによりタンパク質 A+B の構造が変化し、別のタンパク質 C が結合する。

図5 自己組織化のモデル



β と δ は弱く結合する



α と β が結合すると δ は結合しなくなる



α と β に γ が結合すると強く δ が結合するようになる

図6 インデューストフィットモデル



超遠心分析機の展望

有坂先生は、超遠心分析機を用いた手法を研究に多く取り入れている。超遠心分析機とは、試料に大きな遠心力をかけて、試料が沈降していく様子と拡散していく様子をリアルタイムで観察することで、物質の分子量を割り出すことができる装置である。この装置の特徴は、分子量が一千以下のペプチドから分子量が一億程度のウイルスのような巨大な複合体まで、幅広い分子の分子量を分子の形によらず測定できることだ。

分子量を求めることで、相互作用を及ぼし合うタンパク質分子が会合している割合や、結合の強さを求めることができる。また、熱力学的条件を変えて結合の強さを求めることで、その結合がどのような相互作用によるものかも推定することができるようになる。

超遠心分析機による解析は、溶液中での相互作用を高い精度で測定するための有効な手段であるにもかかわらず、現在の日本ではさほど広く用いられていない。なぜなら、得たデータの解釈には超遠心分析の経験、原理の理解がある程度必要であるために解析が難しいという印象をもたれていたこと、超遠心分析機が大型で高価であったことなどから、新しく超遠心分析機を使い始める研究者が少なかったからだ。

しかし近年になって、超遠心分析機は利用しやすくなってきた。それは、超遠心分析機自体が以前より小型化された上に、コンピュータとの連携が進んだことによって得られるデータの精度が上がってきたため、解析のための高度な機能を備えた使いやすいソフトウェアも利用できるようになってきたからである。

超遠心分析は基礎科学、応用科学の研究ともに非常に有用な解析手段であり、有坂先生は超遠心分析機を普及させるべきであると考えている。

先生は、タンパク質製剤の中に含まれる凝集体の定量に超遠心分析機を用いている。タンパク質からなる医薬品は、溶液の状態で長時間放置しておく、タンパク質内部の疎水性の部分が外側に出て、他のタンパク質分子と会合して凝集体を形成する傾向がある。凝集体を含んだタンパク質製剤を投与すると、単量体のタンパク質に比べて凝集体は体内に留まる時間が長いため、免疫細胞と遭遇する機会が増えて、製剤に対する抗体ができやすくなる。すると、製剤の効力が無くなってしまふ心配がある。それを防ぐために、どのような状態で製剤を保管するのがよいのかを検証しなければならない。そのためにはタンパク質に関する高い精度のデータが必要になってくる。

現在のところ、タンパク質製剤の凝集体検出のために信頼に足る精度のデータを得るためには、超遠心分析機による解析が最適であるといわれている。なぜなら、超遠心分析機による解析は、試料が測定の途中で失われないというメリットがあるからだ。タンパク質の解析に一般的に用いられているゲルろ過クロマトグラフィーと呼ばれる手法では、解析の際に試料の一部が失われてしまう。そのため、米国食品医薬品局はゲルろ過クロマトグラフィーに代わる手法として超遠心分析機を用いることを推奨している。超遠心分析機を用いる優れた手法がより多くの研究者に使われるようになれば、タンパク質に関する研究の発展にも大きく寄与することだろう。

生物界ではいまだ原因の解明されていない不思議な現象が多数存在している。先生は、不思議な現象を解明したときに感じられる喜びと驚きに背中を押されて研究を続けてきた。これからも先生は、それらの気持ちを原動力に生物界に残る謎を解き明かしていくだろう。

今回伺ったフェージのお話はとても興味深いものでした。これ以外にも、有坂先生からはさまざまなお話を伺うことができ、自分の進路を見つめ直す大変良い機会となりました。

末筆になりますが、ご多忙の折、取材に快く応

じてくださった上に、質問にも丁寧かつ迅速に対応してくださり、記事の執筆に当たって大変なご協力くださいました有坂先生にこの場を借りて心より御礼申し上げます。

(中島 大佑)