



Title	バクテリオファージφ80の初期遺伝子発現の調節
Author(s)	森田, 隆
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24567
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

バクテリオファージの80の初期遺伝子発現の調節

森 田 隆

目 次

	ページ
序論	1
材料と方法	4
結果	13
まとめと考察	93
文献	99
謝辞	102

序論

大腸菌ファージφ80は、入糸ファージに属する溶原性ファージである。

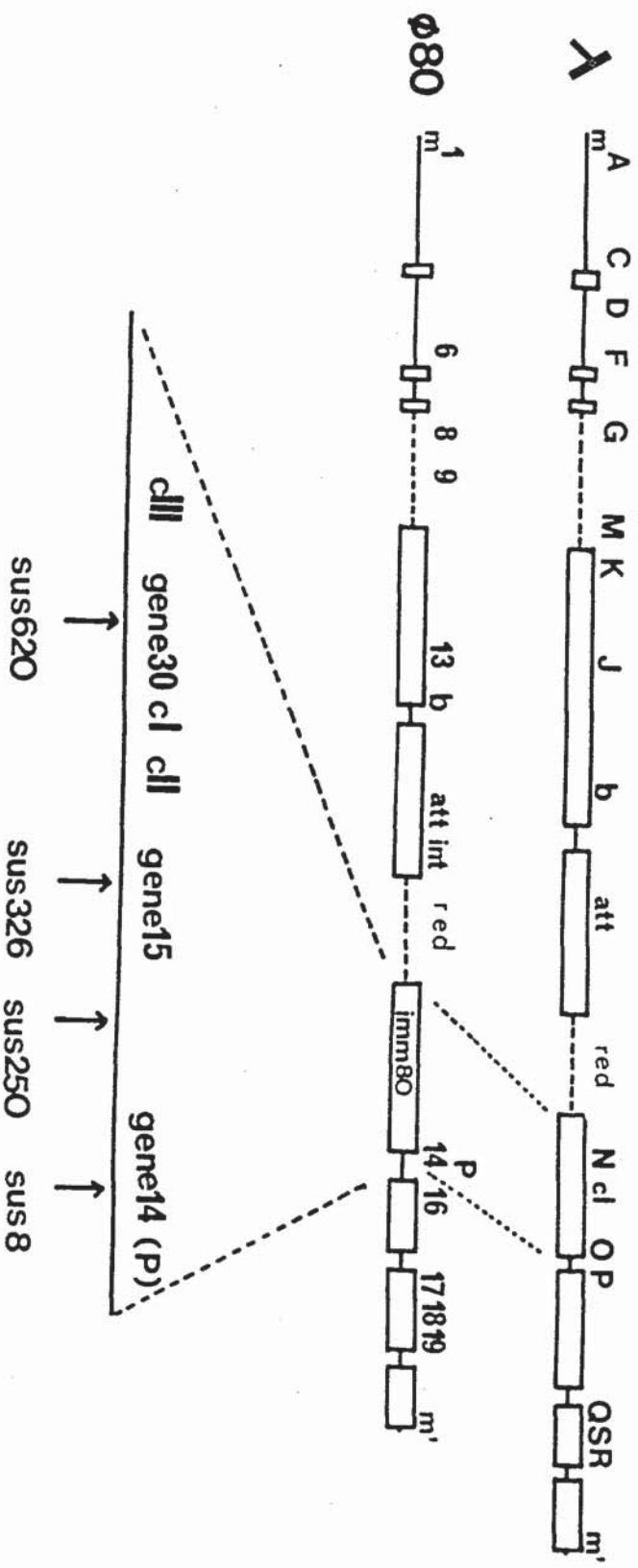
入ファージについては、その遺伝子構成、遺伝子発現、DNA複製、形態形成など広い範囲にわたって深く研究が進められているのに対して、¹⁾ φ80についてそれらの研究はあまり進んでいない。

1960年 松代によて大腸菌からφ80ファージが単離された。その後佐藤らによて多くのsus突然変異株がとられ、その遺伝子の大よその配列が入ファージと類似していて、immunity(免疫性)領域、頭部遺伝子尾部遺伝子領域から構成されていることがわかった。また φ80染色体DNAには 入DNAと相同な部分が散在しているので 種々なハイブリットファージが、E. Signer, N. C. Franklin, A. Oka らによって報告されおり、exonuclease⁵⁾, P 遺伝子産物⁶⁾(入ファージ)のように機能的に交換ができるタンパクのあることを知られている。最近では G. Holomらが φ80と入の複製開始点附近のDNA塩基配列を決定し、両者に相同的な構造のあることを示して。⁷⁾

このように φ80の研究はもっぱら 入ファージ研究の比較の対照として進められ、その相同性に重点が置かれていた。しかし φ80DNAと

入DNAのヘテロ二重鎖の電子顕微鏡による解析の結果は、図1に示すに
よう多くの相違でない部分があることを示している (W. Szybalski, 1969,³⁾
R.W. Davis, 1971⁴⁾)。先に述べた機能的交換可能なタンパクである
exonucleaseや、複製に関与する遺伝子P (ϕ 80では遺伝子14に相当)
そして塩基配列のわかった複製開始点付近はすべて一部の相違部分
についての知見であることを考えると、その他の相違でない部分について
 ϕ 80と入の類似性を单纯に予想することはできない。特に感染初期
遺伝子発現の調節は、入、 ϕ 80とともに興味ある問題である。またこの領域
は相違でないことから、 ϕ 80は「特異なシステムが存在することも予想される。
この論文は、このような ϕ 80の感染初期の遺伝子発現の制御機構を
調べる目的で、これに重きにかかっていると考えられるS15620突然変異の
性質と、またタンパク同定に必要なため導入した欠失変異株の性
質について調べた結果の報告である。

Map of ϕ 80



[図-1] ホモジニア化した得られた λ と ϕ 80 との遺伝子図。

(Szybalski, Davis)

実線の部分は λ と ϕ 80 の相同部分、点線は比較的相似性の少ない部分。空白の部分は相似性のない部分を示している。

材料と方法

1. バクテリアとフージ

実験に用いたバクテリアとフージは表-1, 表-2 に示す。

2. 培地, バッファー

T_A plate は バクトリコットン (Difco) 10.0g, NaCl 2.5g, 酪酸 12g を純水 1l に溶かしたものからつくった。L-プロスは 1l の純水にバクトリコットン 10.0g, 酵母エキス 5g, NaCl 5g, Glucose 1g を溶解し、NaOH で pH 7.0 に合わせたものを用いた。T_I バッファーの組成は 6mM のトリス緩衝液 (pH 7.3), 0.15mg/ml MgSO₄·7H₂O, 0.001% ジュラチン, 0.25mM CaCl₂ である。

HF 基本培地⁸⁾ は 1l 中に, 3g NH₄Cl, 0.5g NaCl, 8g KCl, 10⁻¹M- トリス緩衝液 (pH 7.4), 10⁻³M- MgSO₄, 10⁻³M CaCl₂, 0.1 mg FeCl₃·6H₂O を含む。HF カゼイン培地は HF 基本培地に, 5mM NaKPO₄ (pH 7.2), 8ml の 25% ブドウ糖, 20ml の 4% ピロレビン酸ナトリウム, 0.5ml の チニジン (10mg/ml), 200μg/ml の カザアミ酸を加えて 1l にしたものを利用した。

[表-1]

Bacterial Strains		
Strain	Genotype	Source
594	gal ⁻¹ , gal ⁻² , str ^r ,	
594 thy ⁻	same as 594, thy ⁻	H.Ogawa
159	uvrA ⁻ , str ^r , galK ⁻ , su ⁻	H.Murialdo
N3-1	uvrB ⁻ , gal ⁻ , trp ⁻ , str ^r , su ⁻	M.Imai
N3-1supF ⁻	uvrB ⁻ , gal ⁻ , str ^r , supF ⁻ (su ₃ ⁺)	M.Imai
HfrH	HfrHayes, str ^s , su ⁻ , thi ⁻	F.Jacob
C600S	F ⁻ , thi ⁻ , su ₂ ⁺ ,	H.Ozeki
CA161	HfrHayes, thi ⁻ , lac _y ⁻¹⁴ , str ^s , su ₂ ⁺	E.Signer
C600SrecA ⁻	same as C600S, recA ⁻	H.Ogawa
N6-11	trp ⁻ , gal ⁻ , ilv ⁻ , polA ⁻ , str ^r ,	H.Ogawa
CA5013	HfrHayes, thi ⁻ , lac _y ⁻¹⁴ , str ^s , su ₁ ⁺	S.Brenner
Ymel	Mel ⁻ , su ₃ ⁺ ,	C.Yanofsky
BT63	F ⁻ , lac _{am} ⁻ , trp _{am} ⁻ , met _{am} ⁻ , T6 _{am} ^r , BF23 _{am} ^r , su ₆ ⁺	H.Inokuchi

[表-2]

Phage strains

φ80	A.Matsushiro
φ80gene30sus620	this work
φ80h gene30sus620	R.Tomas
φ80genel5sus326	K.Sato
φ80sus250	K.Sato
φ80genel4sus8	K.Sato
φ80cI ₄	K.Matsubara
φ80cI ₄ genel4sus8	this work
φ80ptrp190h	our collection
φ80Δ3	M.Imai
φ80Δ4	H.Yamagishi
φ80Δ5	this work
φ80Δ6	this work
φ80Δ7	this work
φ80Δ8	this work
OcS ₇ (φ80h ^λ att ^λ imm ⁸⁰ (QSSus7R) ^λ)	A.Oka
Signer171 (φ80imm ^λ (17,18,19) ⁸⁰)	E.Signer
SignerS ₇ (φ80imm ^λ (Q,S,R) ^λ)	E.Signer
φ80cIam7	this work
φ80cIam8	this work
φ80cIam26	this work
φ80cIIamA	this work
φ80cIIamB	this work
φ80Δ3cIam6	this work
φ80Δ3gene30sus620	this work
φ80red12	T.Yamaguchi
φ80red22	T.Yamaguchi
φ80red42	T.Yamaguchi
φ80red43	T.Yamaguchi
P2	H.Ogawa

3. ファージ精製

Φ80ファージは野生株、変異株とも、T入₅₀レート = $10^4 \sim 10^5$ の
ファージを大腸菌とともに軟寒天でまき、37°Cで約15時間培養した。
ほぼプレートの全面が溶解したのに 5mlのT1バッファーを加え、4°C一夜
抽出後、クロロホルムを加え完全に溶菌したものをプレート溶菌液(約
 $10^{10} \sim 10^{11}$ ファージ/ml)として実験に用いた。大量の場合、L-プロスに大腸
菌を約 2×10^8 /ml になるように培養した後、ファージを m.o.i (多重度)
5で感染させ、37°C 4-5時間培養したものを用いた。

in vivo の mRNA ポルス実験や UV 脱臼菌を用いたシンパラベル実験
には、こうして得られたプレート溶菌液を低速遠心して細胞残渣を除いた
後、32,000 × g、90分間高速遠心してファージを沈降させ、これに T1バッ
ファーを加えて懸濁し濃縮したものを用いた(約 10^{12} ファージ/ml)。

DNA フィルターを作りためのファージは、こうして濃縮したものを塩化セシウ
ム溶液の段階的密度勾配遠心法 ($\rho = 1.3, 1.5, 1.7$) で精製したもの用いた。
さらに精製の必要な電子顕微鏡のヘテロ二重鎖実験、DNA の相補鎖分離
には $\rho = 1.5$ の塩化セシウム溶液の平衡密度勾配遠心法により精製したものを
用いた。

4. DNA抽出とDNAフィルター調製

DNA-RNAハイブリドに用いるDNAは、塩化セシウムの段階的密度勾配沈降法によって精製したアーチ (5×10¹²/ml) を 0.1M リン酸, 0.1M NaCl 緩衝液 (pH 7.0) で遠心した後、等容の左エール (リニ酸緩衝液で飽和 IT: の) を加え、30分間振盪して抽出 (T: 水槽と)。1×SSC で遠心しエールを除いたものを、100°、10分間熱処理してDNAを変性させ、3×SSC で希釈後、ミリカ®アスコルターに 40μg DNA/フィルターに沿うように吸着させ。3×SSC で洗浄後、乾燥し、8等分したものの (5μg DNA/reactor) をハイブリッド用フィルターとして用いた。

5. DNA複補鎖分離とDNAフィルター調製

9)
DNA複補鎖分離は W. Szybalski らの方法に従つた。平衡密度勾配法で精製した 80 野生株アーチ (DNA 100μg に複合) に poly UG (100μg), ガルコシン酸ナトリウム、EDTA を加え、pH 8.0 に調整した後、3 分間沸とうさせ急速 IT: CsCl を加えて $n_D^{25} = 1.4022$ に調整し、ベックマン 40ローターで 30,000 r.p.m. × 60 時間 (13~15°) 遠心後、分離し OD₂₆₀ を測定した。図 28 で得られた 2 分離を集め、0.3N KOH で poly UG を除いた後 2×SSC で遠心した。最初に混入した複補鎖を除くため 66°4 時間アルセナイト後徐冷し

6×SSC で希釈し ミリガラフィルターに $5\mu\text{g}$ / フィルターに なみように 吸着せ.

8等分して ($0.63\mu\text{g}$ DNA / sector) 用いた.

6. mRNA調製と、DNA-RNAハイブリット形成法.

107

mRNAのパルスラベルと DNA-RNAハイブリット形成法は 今本らの方法に従つた。大腸菌を L-プロテイン 37° , 2時間 培養したものを低速遠心で集菌し、T₁バッファーで2回洗ったものを T₁バッファー ($1\text{mM KCN$ を含む) に $3 \times 10^9/\text{ml}$ になみように 懸濁した。m.o.i 5で ファージを加え、 30° , 10分間 吸着させた後低速遠心で集菌して 遊離ファージを除き、 $3 \times 10^{10}/\text{ml}$ になみように $1\times\text{VB}$ 培地 (Vogel & Bonner, 1956) に懸濁した。この懸濁液 0.2 ml を 20 mM 酢酸 (0.5 mM) を含む $1\times\text{VB}$ 培地 3 ml に加えて、 30° で 激しく振盪して 反応を開始した。パルスラベルは 指定の時刻に $150\mu\text{Ci}$ の $^3\text{H-U}$ ジン ($20-25\text{ Ci}/\mu\text{mole}$) を加え、1分間 30° で 激しく振盪して 行なった。ラベル後、T₁ バッファー: 0.005 M MgCl_2 , 0.01 M NaNO_3 , $150\mu\text{g/ml}$ のクロロマセチンを含む 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH}7.3$) を氷冷したものの (停止液) に 菌を入れて 反応を止めた。低速遠心で集菌し、 $30\mu\text{g DNase}$, $600\mu\text{g}$ リソzyme を含む 停止液 2 ml に 菌を懸濁した後、津結融解を 3回繰り返して 細胞を破碎した。これに 0.1 ml 酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH}5.2$), 0.2 ml

SDS(5%)を加えて完全に可溶化LT後、0.005M $MgCl_2$ を含む0.01Mトウス
塩酸緩衝液(pH7.3)で自己沈殿させた。エーレ3.5mlを加えて液を90秒
振盪してRNAを水層に抽出した。水層に2% 酢酸ナトリウムと2倍容量の
エチルアルコール(-20°)を加えて-20°でRNAを沈殿させた。これを低
速遠心で集めて、0.5M KClを含む0.01Mトウス塩酸緩衝液1mlに溶解し
た。これをミリポアフィルター(HAWP, 0.45 μm , 25mm)で3遍て混在している
タンパクを除いた後、再びアルコール沈殿によってRNAを集めた。沈殿した
RNAを0.5M KClを含む0.01Mトウス塩酸緩衝液1ml(pH7.3)に溶解して
ハイブリッド形成用RNA試料(約200 μg RNA/ml)とした。
ミニチューブ(内約0.5cm, 長さ3cm)にDNAオルターを入れ、調製LT:RNA
試料0.1ml(約200 μg RNA/ml)を加えて封じた。66°で18時間保温
してハイブリッドを形成させた。反応後フィルターをRNase(5 μg /ml, 1×SSC)
で37°, 30分間処理し、1×SSCで5回洗った後、乾燥し液体シンチレ
ーションカウンターによってDNAオルターに残った放射活性を測定した。

7. UV(紫外線)照.射菌

8)

11)

UV照.射菌の調製はあくまでも M. Hayashi と A. Oppenheim の方法
に従った。大腸菌をHFカザマニ酸培地で一晩培養したものを再びHF

カゲアシ酸培地に $1 \times 10^7/\text{ml}$ に分よりに植え 37°で培養すると 3 時間まで
菌濃度は約 $1 \times 10^8/\text{ml}$ である。対数期にあたる。低速遠心で集菌し、HF
基本培地で 2 回洗った後、菌濃度を $3 \times 10^8/\text{ml}$ に調整する。紫外線を
 $1200 \text{ erg}/\text{mm}^2 \cdot \text{min}$ の強さで指定した時間攪拌しながら照射した。
照射後 37°で 15 分間振盪した後、ファージを指定した m.o.i. に分よりに
加え、30°で 10 分間静置して吸着させた。この懸濁液 1 ml は 10 倍濃度の
HFLA 培地（1 l の HF 基本培地に、50 mM NaKPO₄ pH 7.2, 25% プドウ糖
80 ml, 4% ピーレビン酸ナトリウム 200 ml, チミジン (10 mg/ml) 5 ml, オ・エビ 19種
のアミノ酸をそれぞれ 0.5 μg/ml を加えたもので、テベルするアミノ酸を除いたもの）を 0.1 ml,
¹⁴C-ロイシン (278 mCi/mmol), 又は ³⁵S-メチオニン (約 700 Ci/mole) を 10 μC
加えて、30°で 20 分間激烈に振盪した。反応後 氷冷した L-プロテイン 0.5 ml 加
えて、氷冷し低温 (4°) で低速遠心して菌を集め、これに電気泳動用の SDS
を含む試料緩衝液 15 μl を加えて懸濁して -20°で保存した。電気泳動
の際は、これを 3 分間、100°で溶解させ、再び低速遠心して不溶物を除去した後、
用いた。

8. SDS ホリアクリルアミドゲル電気泳動法

12)

電気泳動はほぼ U. K. Laemmli の方法に従った。試料緩衝液の組成は

0.2M リンス・塩酸 (pH6.8), 8% SDS, 2M β -メルカプトエタノール, 10% グリセロール
0.025% BPP であった。溶離用ゲルはアクリルアミド 8%, ビス・アクリルアミド 0.21% で
分離用ゲルは 15% アクリルアミド, 0.067% ビス・アクリルアミド であった。電気泳動
は試料重層後 20 分間, 70V, 10mA/ゲルで、その後 100V, 12mA/ゲルで
4 時間行なった。泳動後 5 分間にゲルを乾燥し、オトラジオグラフィーを行なった。

9. ヘテロ二重鏡の電子顕微鏡による解析。

13)

ヘテロ二重鏡形成は Davis の方法に従つた。精製したフージ E 0.17M EDTA
(pH8.5) 中で二種混合し、NaOH でアルカリ処理して DNA を変性させて後、70% カル
ムアミド、NaCl、トリス・塩酸緩衝液 (pH8.5) 中で 26°, 1 時間透析を行うことによつて
ハイブリット形成を行なつた。50% ホルムアミド中でさらに 4°, 4 時間透析した後、シ

14)

クロムを加え、18% ホルムアミドの展開下層に広げた。パロジオレンジをはってグリット
に吸着させ、酢酸ウラニウムで染色。イソペンタンで脱色した後、白金カラジウムで蒸着し、
検鏡した。

結 果

1. φ80 sus620 突然変異のマッピング

R.Tomas によって単離された φ80sus620 変異株は φ80 のプロモーターマップで最も左側に位置する必須遺伝子のアシパー突然変異体であることが知られている。φ80sus620 変異株は、 KU^+ の大腸菌で増殖し、plaques を形成するが、その特異性は表-3 に示した。φ80sus620 変異株はそのアシパーコドンに Ser 又は Gln を置き換える SUS^+ 又は SUS^{\ddagger} 大腸菌のみ増殖可能であった。

sus620 変異の位置をさらに正確にマップするため 図-2 に示すように φ80hsus620 と φ80cI4sus8 との組換え実験を行ない、その組換え体の非淘汰遺伝標識を調べることによって cI と sus620 変異の位置関係を決定した。

L-プロテイン培養した大腸菌 C600S を集菌し ($1 \times 10^9/\text{ml}$)、φ80hsus620 と φ80cI4sus8 をそれぞれ m.o.i. 5 で重感染させた。37°C 10 分間吸着させ、追感染を防ぐため L-プロテイン 100 倍希釈後、37°C 150 分振盪培養した。クロロホルムで溶菌した後、大腸菌 C600S 又は 594 とともに T1 プレートにまでファージ数を測定した。その結果を図 2 に示した。二種のファージを重感染させた場合は 594 で増殖できる組換え体が 2.6% 出現した。

$$\text{組換え頻度} (\%) = \frac{\text{(組換え体)}}{\text{(子アーチ挑査数)}} \times \frac{100 \times 10^4 \times 10}{78 \times 10^6 \times 10} \times 2 \times 100 = 2.6 (\%)$$

表-3] $\phi 80sus$ 620, $\phi 80hsus$ 620のカプレッサー感受性

	strains	$\phi 80$ wild	$\phi 80$ gene30sus 620	$\phi 80h$ gene30 620
su^-	594	0.9	6×10^{-5}	7×10^{-5}
	159	0.8	7×10^{-5}	6×10^{-5}
	N3-1	0.8	8×10^{-5}	9×10^{-5}
	AEl	$< 10^{-6}$	$< 10^{-6}$	9×10^{-5}
su_1^+ (Ser)	CA5013	0.7	1.1	1.0
su_2^+ (Gln)	AElsu ₁ ⁺	$< 10^{-6}$	$< 10^{-6}$	1.4
	C600S	1.0	1.0	1.0
	CA161	0.9	0.9	0.9
su_2^+	AElsu ₂ ⁺	$< 10^{-6}$	$< 10^{-6}$	1.1
	Ymel	0.8	7×10^{-5}	1×10^{-5}
	N3-1supF ⁻	0.9	8×10^{-5}	1×10^{-4}
su_6^+ (Lys)	BT63	0.9	5×10^{-5}	6×10^{-5}

$\phi 80$ 野生株, $\phi 80sus$ 620, $\phi 80hsus$ 620 をそれぞれ C600S(su_2^+) とともに T_λPAV-1 にまき、そのカバ率を 1.0 として、他の菌上でのプレート効率を示した。

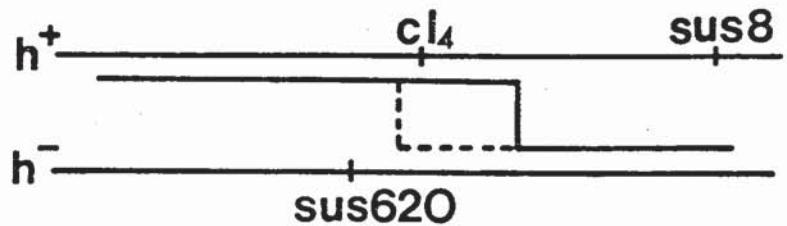
su⁻ 菌である 594 から得られた 組換え体は ほとんどが クリアー であり、ターピッド (turbid) との比は 7500 : 27 であった。次に これらが 遺伝 孫孫である h⁺ (host range) について h⁺ であるか h⁻ であるかを 調べた (h⁺ ファージ は 大腸菌 AE1 (trp⁻, ton B) で 増殖 できるが、 h⁺ ファージ は 増殖 できない)。クリアーブラーフを 20 個 調べたところ h⁻ : h⁺ = 2 : 18 、また ターピッド ブラーフを 27 個 調べたところ すべて h⁺ であった。このことから cI4 と sus620 变異 の 位置関係は sus620 が cI4 の 左側 にあることにあり、その 距離 は sus620 变異 と sus8 变異 の 距離 を 2.6% として 場合。

$$2.6(\%) \times \frac{27}{7500} = 0.01 (\%)$$

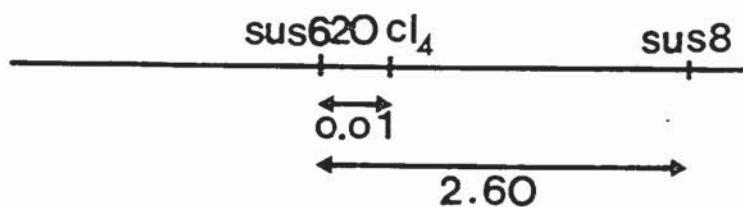
より、0.01% となつた。

同様の結果が φ80sus326 と φ80h sus620 の 組換え実験 からも 得られており、sus620 变異 が cI のすぐ左に マップ される アンバー 突然変異 である と 結論 した。以上の結果を 図3.4 に 示した。

sus620 变異 に対応する 遺伝子 は ファージ 増殖 に 必須 であり、この 遺伝子 を 遺伝子30 と 命名 した。

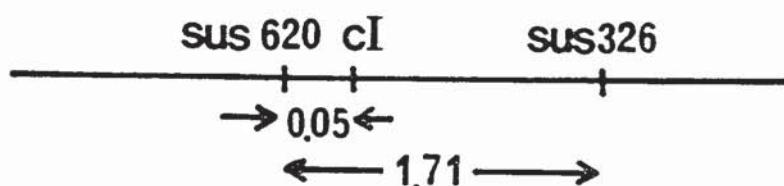
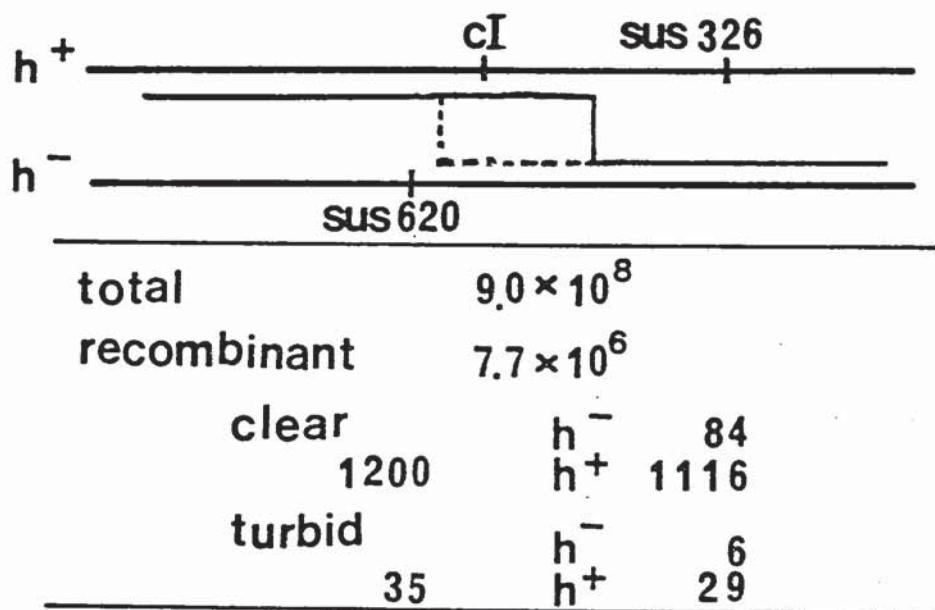


total	7.8×10^8		
recombinant	1.0×10^7		
clear	7480	h^-	2
		h^+	18
turbid	27	h^-	0
		h^+	27



[図-2] $\phi 80\text{h}_{\text{sus}620} \times \phi 80\text{c}_{\text{I}_4}_{\text{sus}8}$ の組換えによる $\text{sus}620$ 変異のマッピング。

方法及び結果については〈結果〉で詳しく述べた。上の図で折れ線はこの組み換えによりできる su 感度性がないマージ遺伝子を示している実線は I_4 変異を持ちクリアなアラーフを形成し、点線は野生株と同じ遺伝子構成である正常アラーフを形成するはずである。非淘汰遺伝座識はカギの左にある。クリアマージについては、その内の20個についてマークー(h)を調べた。



[図3] $\phi 80 h$ sus 620 \times $\phi 80 cI_4$ sus 326 の組換えによる sus 620 変異のマッピング

図4と同じ方法で行なった。

Genetic Map in ϕ 80 Early Regulatory Region

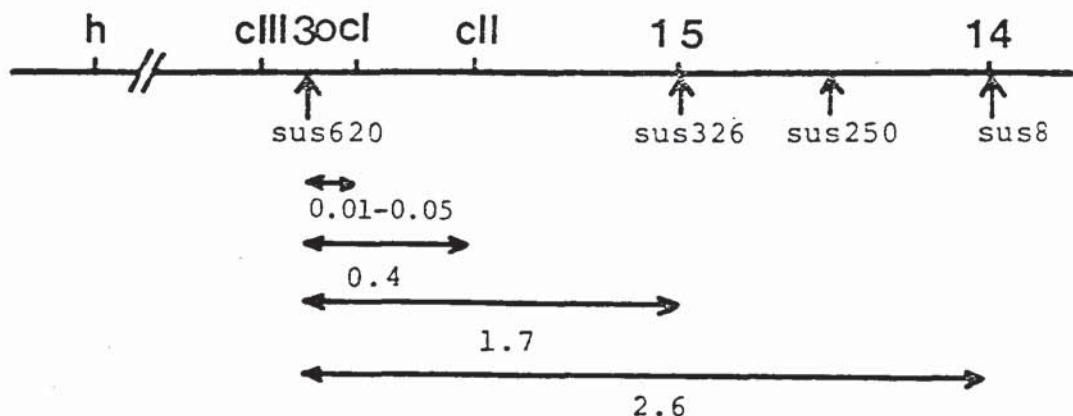


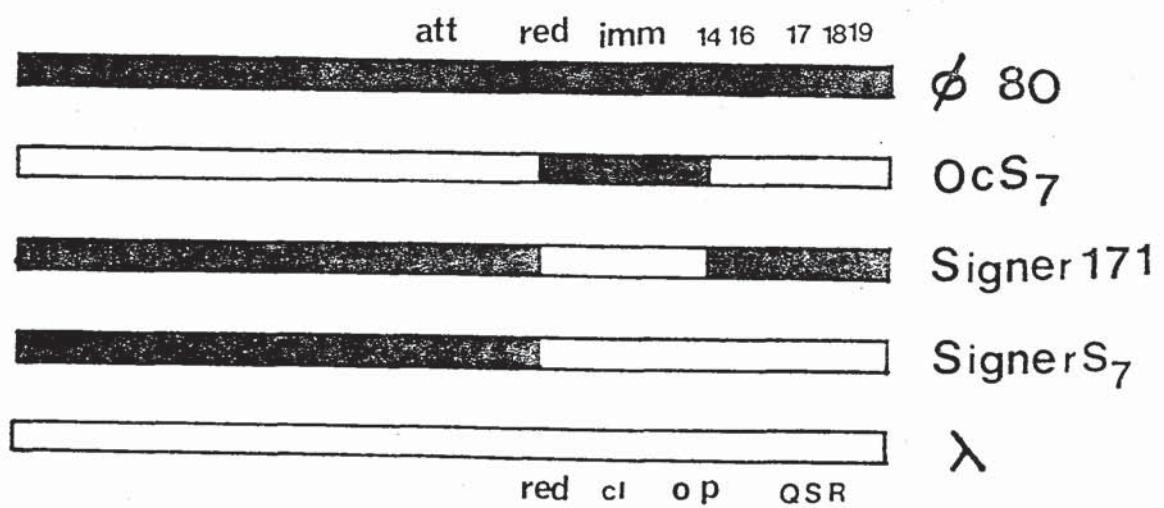
図4 ϕ 80 sus620 変異の位置

図5、図6の結果を示した。cIとsus620変異の距離は、sus326を用いた場合と、sus8を用いた場合でやや異なるが、cIとの位置関係については、cIの左側近傍にsus620変異がマップされることが確定された。

2. φ80野生株とφ80sus620変異株の転写様式

15)

φ80が大腸菌に感染した後どのようなmRNA合成をするかについてはSzybalskiらの報告があるのみである。彼らの実験によればφ80感染後mRNA合成様式は入と似ていて、感染後30分まではφ80DNAの上鎖の合成が主に行なわれその後下鎖の合成に移ることが知られている。しかし詳細については知られていない。φ80野生株とφ80sus620変異株を SU^- である大腸菌(HfrH)及びこれと遺伝子構成が同じで SU_2^+ の大腸菌(HfrH CA161)に m.o.i. 5 で感染させ、感染後 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 分後には ^{3}H -ウリシントRNAを 1 分間パルスラベルレーテ。フェノールで RNA を抽出 1T₁ 後、φ80、入およびそれらのハイブリッドファージDNAを錠型としてフィルター法でハイブリットを形成させた。用いたハイブリットファージDNAは図 5 のようにφ80のimmunity領域を含む、red より 遺伝子 15, 14 付近までの主としてφ80 immunity 部分をもつ OcS_7 DNA、それと共に red より 遺伝子 0, 遺伝子 P 付近までが入DNAで他の部分がφ80DNAから構成された Signer 171 DNA、また red より 遺伝子 Q, S, R ままである Signer S_7 DNA の 3 種類を用いた。このようなファージDNAをハイブリット形成の錠型として用いることにより、合成されたファージmRNAを (i) 初期 mRNA (OcS_7 DNA とハイブリッドを形成する、red ~



[図5] RNA-DNAハイブリッド形成に用いた~~錆型~~DNA.

黒い部分はφ80の、白い部分は入のDNAを示してある。

immunity 領域の転写), (ii) 中期 mRNA (Signer 171 DNA とハイブリッドを形成するが, SignerS₇ DNA とはハイブリッドを形成しない, 遺伝子 14, 15, 16 付近の転写), (iii) 後期 mRNA (SignerS₇ DNA とハイブリッドを形成する, 遺伝子 17, 18, 19 及び, 頭部・尾部 遺伝子の転写) に分けて解析した.

図 6-C は約 80 野生株を 大腸菌 CA161 に感染させた場合、
合成されるフージ mRNA 合成速度の経時変化を示したものである。この特徴を調べます
まず第一に、感染後 15 分までに合成されるフージ mRNA のほとんどは OcS₇ DNA
ともハイブリッドを形成することがわかった。すなはち red エン immunity 領域が感染後すぐ
に転写されていることがわかった。そしてこのような初期 mRNA 合成速度は感染後約 15
分で低下しその後全体の約 4% の割合で合成が続いた。入についてもこれと似た
現象がよく知られており、turn off と呼ばれている。すなはち入の直前にある several
遺伝子産物が P_R, P_L から始まる初期 mRNA 合成を抑制する現象である。中 80
にみてもおそらくこれと似た機構が存在し、初期 mRNA 合成の低下を起こす
のではないかと考えられる。
第二に、野生株では フージ感染後 25 分から
フージ mRNA 合成速度が急に上昇した。この mRNA は OcS₇ DNA とハイブリッドを形
成した。しかレーチ一方、SignerS₇ DNA とのハイブリッド形成率が Signer 171 の

それより低いことから、このmRNAは遺伝子14, 15, 16付近の転写によるものであると考えられる。このように感染後20~30分にかけて中期mRNA合成が増加することがわかった。第三に感染後40分を過ぎるとフージmRNA合成速度は全体の合成速度の10~15%にも達した。これは遺伝子14, 15などが表現して可能になったDNA複製に伴う、遺伝子の dose効果によるものと考えられる。このRNAはSigner 171, SignerS₇とハイブリッドを形成し、時間が経つにつれ両者の差が少なくななる傾向を示していることから、遺伝子16, 17, 18を含む頭部・尾部タシヤフなどをコードしている後期遺伝子が主として転写されたものと考えられる。このような ϕ 80野生株の転写様式は、Szybalskiらの結果と、r鎖の転写と中期, 後期のmRNA (Signer DNAとハイブリッド形成する) に、s鎖の転写を初期mRNA (Oc S₇ DNAとハイブリッド形成する) に対応させることによって一致することがわかった。

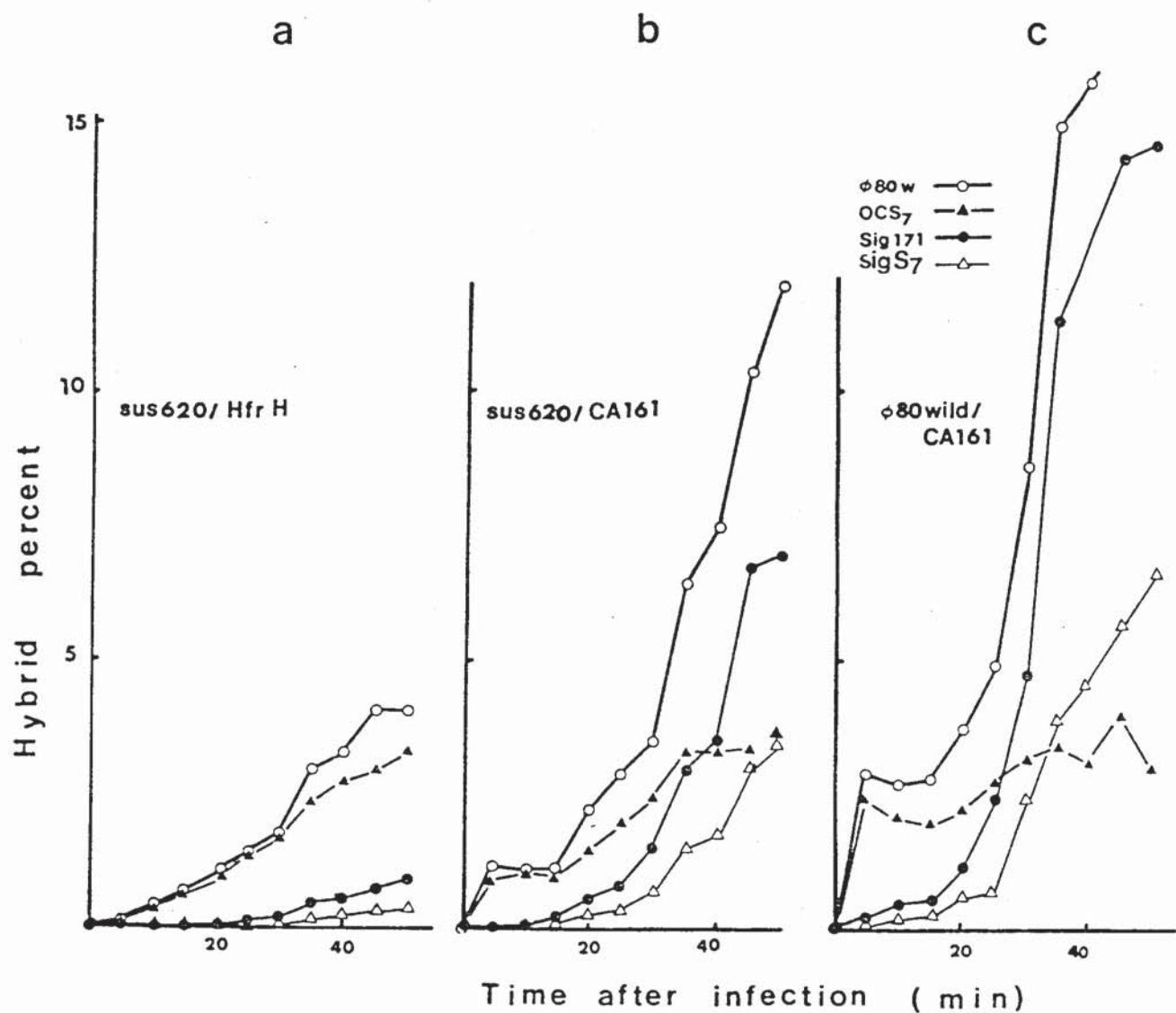
次に ϕ 80sus620変異株をSU-菌(HfrH)に感染させた場合の転写様式を調べた。図6-aのようにフージの増殖できない(non-permissive) SU-菌中でもsus620変異株はmRNAを合成しており、感染後時間の経過とともにその合成速度が単調に増加した。感染後50分でパルスラベルされた全RNA中、フージmRNA合成速度は5%にも達した。このRNAはまた、そのほとんどがOc S₇ DNAとハイブリッドを形成し(75%以上)、その逆

i. Signer 171, Signer λ DNA とはハイブリッドを形成しなかった。このことから
b. non-permissive 条件では、 $\phi 80$ sus 620 変異株は immunity 領域
を含む初期 mRNA の合成のみが起こっていて、遺伝子 14, 15, 16 付近の中期 mRNA
および後期 mRNA の合成がほとんど認められないことがわかった。

次に $\phi 80$ sus 620 変異株を su_2^+ である大腸菌 Hfr HCA16112
感染させた場合の転写様式を 図 6-b に示す。この permissive 条件
での転写様式は non-permissive の場合と異なり、 $\phi 80$ 野生株を感染
させた場合の転写様式に似ていることがわかった。すなはち 感染後 10~15 分
までの初期 mRNA 合成とその低下、25~40 分までの中期 mRNA 合成、
感染後 40 分以降の後期 mRNA 合成への変移が見られた。また全体に合
成速度が 野生株の場合に比べて低いのは、 su_2^+ によるサプレッサーが存在しないこと
が原因として考えられる。

このように sus 620 変異株の non-permissive 条件下での転写様式は
野生株、又は permissive 条件下での転写様式と非常に異なっており (i) 初期
mRNA 合成のみ起こり、中期・後期 mRNA が合成されない、(ii) 初期 mRNA
合成の低下がない、という特徴をもつことがわかった。このことは sus 620 に対する
応答する遺伝子 30 が 中期・後期 (r 鎮) の転写に必須であると同時に、25

直接または間接的に初期 mRNA 合成の抑制（turn off）にいたる現象、
（鎖）に關している転写調節遺伝子であることを示している。



[図 6] φ80野生株とφ80sus620変異株の転写様式

大腸菌 HfrH(su^-)と CA161(su_2^+)にφ80野生株とφ80sus620

変異株を感染させ(m.o.i. 5)。指定した時刻に ^{3}H -ラジンで1分

間パルスラベルし、RNAを分析した。(a) HfrH(su^-)にφ80sus620

を感染させた(non-permissive)、(b) CA161(su_2^+)にφ80sus620

を感染させた(permissive)、(c) CA161(su_2^+)にφ80野生株を

感染させた。〈材料と方法〉、〈結果〉に詳しく述べた。

3. UV照射菌を用いた ファージタンパクの分析

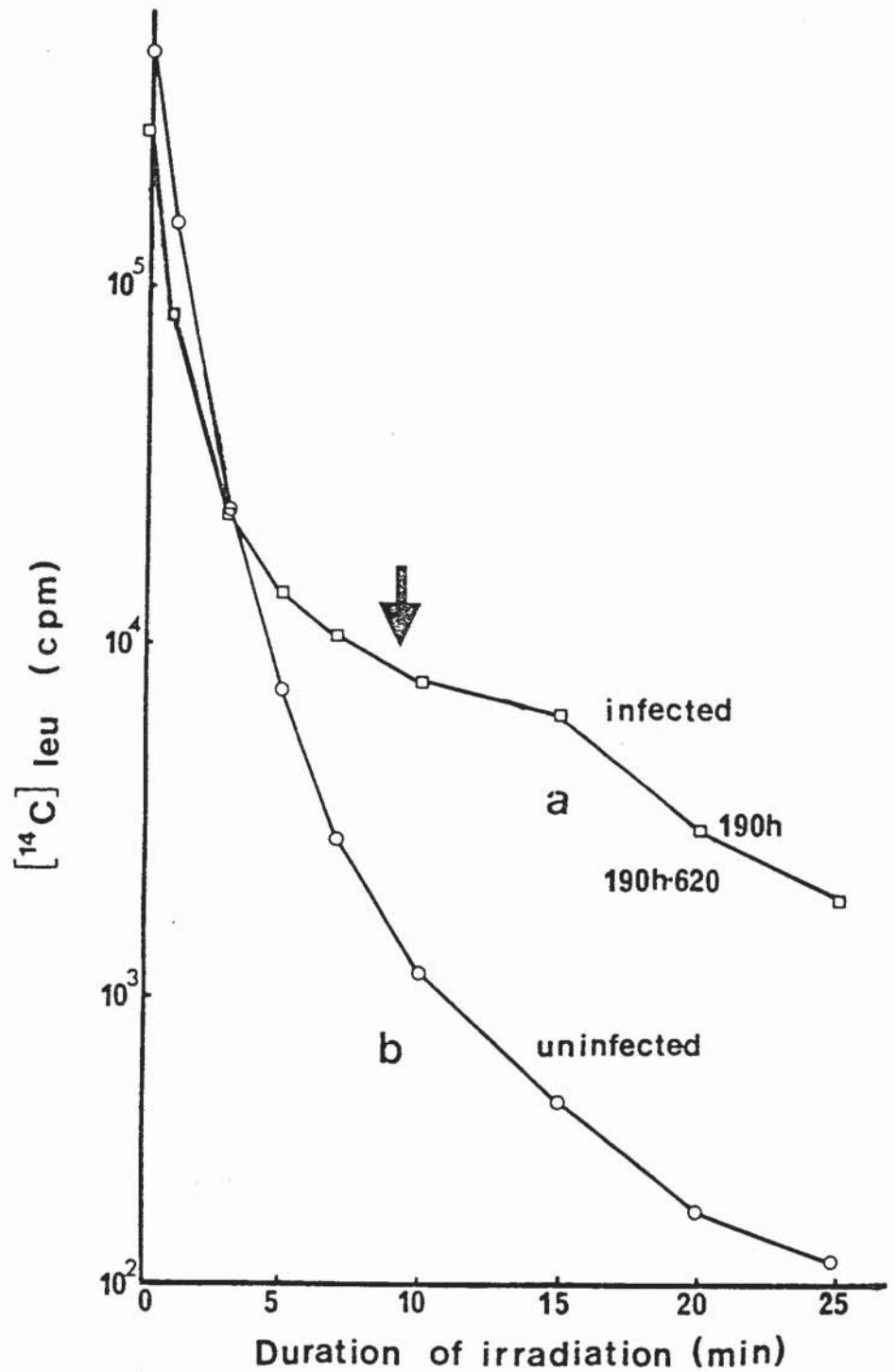
(A) 条件設定

前述のように ϕ 80 突尾株が SU-菌に感染した場合、初期 mRNA 合成は見られるが、中期・後期 mRNA 合成が行なわれていなかった。このことは当然、感染したファージの合成するタンパクの分子種にも影響されると考えられており、次にこれらのタンパク分子種のパターンを比較した。

ファージを感染させた大腸菌には大腸菌由来のタンパクが多く、ファージ DNA によってコードされるタンパクだけを同定することのみずかしい。T 系 ファージなどの場合には 感染した ファージが宿主大腸菌のタンパク合成を停止 (shut off) するので 新たに合成されるタンパクを放射性同位元素でラベルすれば、ファージタンパクのみが検出できる。しかし ϕ 80 の場合、感染後、宿主大腸菌に対する shut off は弱いので、UV 被射大腸菌を用いて実験を行なった。この系は M. Ptashne が用いたもので、UV 感受性大腸菌に UV を照射すると大腸菌 DNA は損傷による転写・翻訳されないが、この菌にファージを感染させると、ファージタンパクだけが合成されるものである。これを放射性化合物でラベルし SDS ポリアクリルアミド ゲル電気泳動法により分析できる。この系を ϕ 80 に適用するため 大腸菌への UV 被射量、UV 被射菌への ϕ 80 ファージ吸着条件を検討した。

〈材料と方法〉で述べたように集菌した大腸菌 159 に UV を 0, 1, 3, 5, 7
10, 15, 20, 25 分間 照射後、 $\phi 80_{\text{ptrp}} 190 \text{h}$ を m.o.i. 100 で感染させた場合と、
アーチを感染させない場合について、 ^{14}C -ロイシンの取り込みを比較した。ラベル
した大腸菌を 5% TCA 中で、100°, 15 分間 处理した後、ミリホップフィルターで過し、
フィルターに残った放射活性を測定した。図 7 のように大腸菌への UV 照射量を
増していくと ^{14}C -ロイシンの取り込みはアーチ感染、非感染の両方の場合について急に
減少することがわかる。しかし $\phi 80_{\text{ptrp}} 190 \text{h}$ を感染させた場合(a)、UV 照射量
が 5000 erg/mm^2 (約 4 分) 以上になると明らかにアーチを感染させない場合(b) と差が
てきたり、この差がアーチタンパクに取込まれた放射性化合物の量を示している。アーチタ
ンパクへの取り込みが宿主に対して十分大きく (10 倍程度) いかなくできることは、け
少ない UV 照射量とて $10,800 \text{ erg/mm}^2$ ($1200 \text{ erg/mm}^2, \text{ min} \times 9 \text{ min}$)
を選び、以後特にことわらない限り、この線量を実験に用いた。

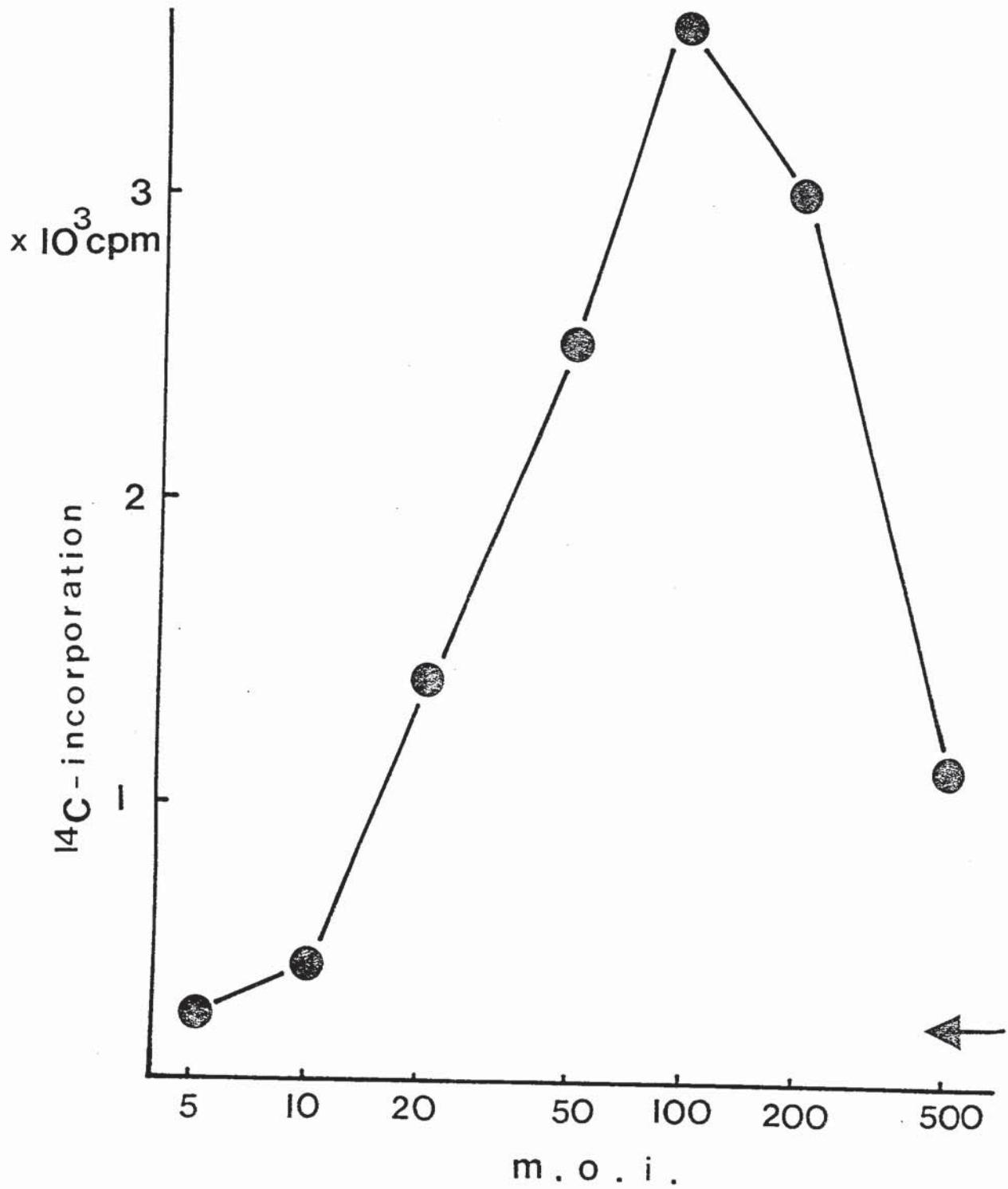
次に感染させたアーチの m.o.i. を検討した。UV を照射した大腸菌
159 に $\phi 80_{\text{ptrp}} 190 \text{h}$ を種々の m.o.i. で吸着させ、その後 ^{14}C -ロイシンの取り込み
を調べたのが図 8 である。感染させたアーチの m.o.i. の高い方が、取り込みが多く
なるが、m.o.i. 200 ~ 500 になると取り込みは逆に減少した。したがって以下
の実験では m.o.i. 50 で感染を行なった。この m.o.i. 50 という値は、入で 27



【図7】 ファージの ^{14}C -ロイシンの取り込みに対する宿主大腸菌へのUV照射の
(159)

効果 (a) UV照射後、 ϕ 80plrp190hをmoi. 100で感染させた場合。

の ^{14}H -ロイシンの取り込み (b) ファージを感染させなかった場合の取り込み。



[図 8] UV 照射大腸菌の ^{14}C -リシンの取り込みに与える ファージ m.o.i.

の量を算定。UV を $10,800 \text{ erg}/\text{mm}^2$ 間隔で照射した大腸菌に $\phi 80\text{ptrp}190\text{h}$

を指定した m.o.i. で 感染させ、 ^{14}C リシンの取り込みを調べた。矢印は

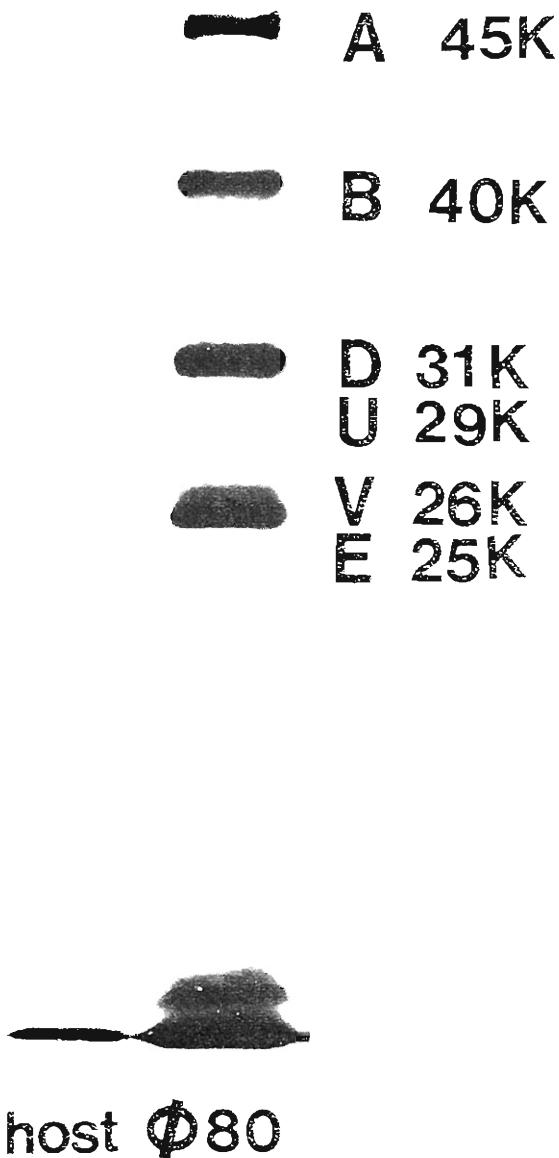
ファージを感染させなかった場合の取り込みのレベルである。方法について

は本文を参照。

一般に用いられている m.o.i. 5~30 (A. Oppenheim, M. Ptashne ¹¹⁾, ¹⁶⁾) という値と比較すると高いが、これは ϕ 80 の吸着には効率のよくない HF 基本培地と、う非常に塩濃度の高い (KCl 0.1M) 培地中で行ったためで、実際の effective m.o.i. は入での実験に用いたものと同じ程度にみると考えられる。

(B) ϕ 80 野生株と ϕ 80sus 620 変異株のタンパクパターンの比較

< 材料と方法 > に従い 上記の条件で UV 照射大腸菌に ϕ 80 野生株を感染させ、³⁵C-ロイシンで 20 分間ラベルして試料を調製し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法によつて分析した。しかし ³⁵C-ロイシンでは放射活性が低く、短時間ではオートラジオグラフがよくないため、以降の電気泳動パターンはすべて ³⁵S-チオニン (約 700 Ci / mmol) でラベルした試料を用いた。両者で major バンドに関する限り電気泳動パターンに差はみかなかった。図 9 が ϕ 80 野生株の合成するタンパクのゲル電気泳動パターンである。非常に濃い 5 本の major バンドと 2 本の minor バンドが主要由来のタンパクである。また低分子領域 (約分子量 10,000 以下) に宿主由来の弱いバンドが見られるが、これは UV 照射した宿主大腸菌由来の不完全なペリヘプチドである。また、検出されたそれぞれのタンパクバンドについてその分子量を求めた。そして各バンドを次のようにアルファベットで命名した。 (図 9 参照。)



[図9] $\phi 80$ 野生株の合成する初期タンパク

UVRA⁻大腸菌159を<材料と方法>で述べたように HF-リザーブ酸培地

で培養後、UVを $10,800\text{erg/mm}^2$ 照射 2h 、 $\phi 80$ 野生株を $m.o.i 5$ で

感染させたものと、させないものの对照とし、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ に丁度うるい $3\beta\text{S}-\text{ヌクニン}$

を加えて20分間、 30°C で振盪した。菌~~エキス~~ SDS-アガロ糖衝撃液で溶離、可溶化

し 15% アツルヒミドゲル電気泳動でタンパクを分析した。

major バンド； バンド A (45 K), バンド B (40 K), バンド D (31 K)

バンド E (25 K).

minor バンド； バンド U (29 K), バンド V (26 K),

次に ϕ 80 野生株と ϕ 80sus 620 変異株のタンパクのパターンを比較

した。sus 620 変異は アンバー 突然変異であるため、もし この遺伝子 30 の產

物が野生株のタンパクパターンで識別できるなら、su⁺ 菌に ϕ 80sus 620 変異株を

感染させた場合、その遺伝子産物は野生株のそれより 分子量が小さくなっているか

消失しているはずである。また su⁺ 菌ではこれが野生株の大きさに回復していく

はずである。先に用いた大腸菌 159 は su⁻ であり、これと isogenic で ϕ 80

の感染する su⁺ 菌は 单離性されていないので、159 と同じく UV 感受性菌 (UVRB⁻)

で、trp 要求性のみ異なる N3-1 (su⁻, trp⁻) と N3-1 supF⁻ (trp⁺, su₃⁺)

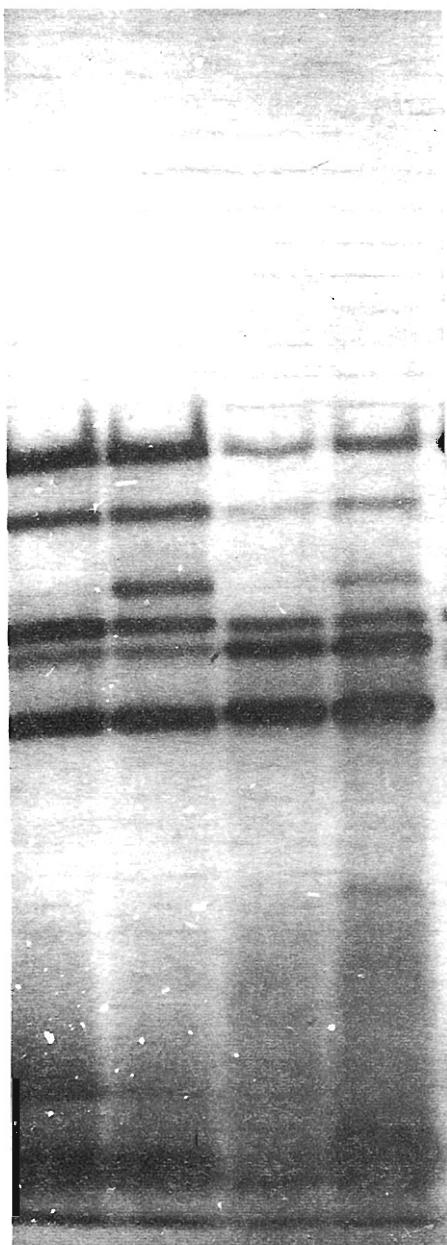
を 159 と 同様の条件で 実験に用いた。図 10 にその結果を示した。(a),(b) は ϕ 80

野生株を N3-1 (su⁻), N3-1 supF⁻ (su₃⁺) に、(c),(d) は ϕ 80sus 620

変異株を N3-1 (su⁻), N3-1 supF⁻ (su₃⁺) にそれぞれ感染させたものであ

る。このオートラジオグラフより 次の三つの事実が 明らかになつた。

第一に、 ϕ 80 野生株を N3-1 (su⁻) に感染させてきたタンパクは、前述の 159 (su⁻) の場合と同じパターンを示したが、N3-1 supF⁻ (su₃⁺) に



a b c d

A , 45K
 B , 40K
 C , 34K
 D , 31K
 E , 25K
 (V , 26K)

[図10] ϕ 80野生株と ϕ 80sus620変異株の初期タンパクの比較

UV照射したUvrB⁻菌 N3-1 及び N3-1supF⁻(su3⁺)に ϕ 80

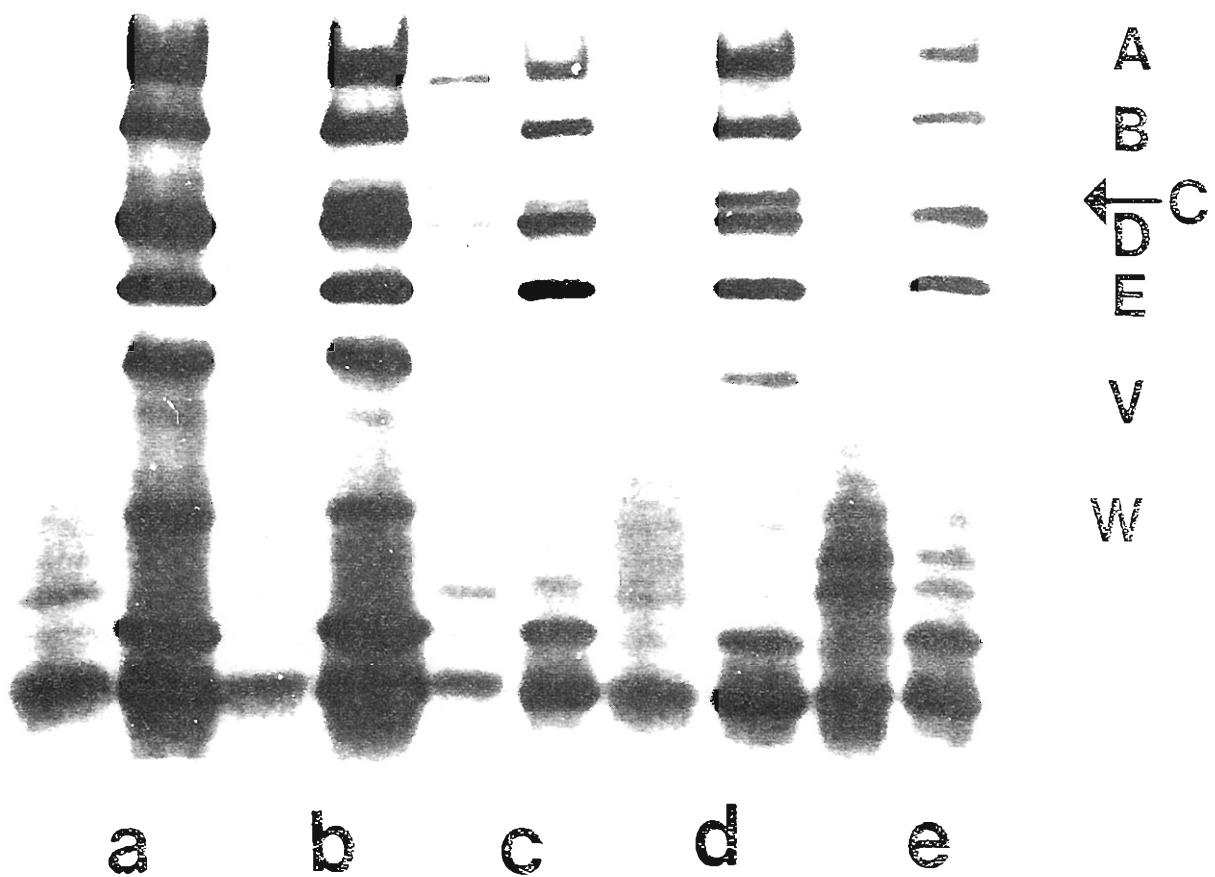
野生株と ϕ 80sus620変異株を感染させ、³⁵S-メチオニンでラベル後

15%アクリルアミドの SDSポリアクリルアミド電気泳動によってタンパクを分析した。

(a) ϕ 80野生株をN3-1(su⁻)に感染させた。(b) ϕ 80野生株をN3-1supF⁻(su3⁺)に

(c) ϕ 80sus620変異株をN3-1(su⁻)に、(d) ϕ 80sus620変異株をN3-1supF⁻(su3⁺)

感染させた場合は新たに 34 K バンドのタンパクが出現した。この 34 K のバンドは su^+ 菌に感染させた場合にも検出できず。このタンパクは UV 照射した ファージ非感染菌 N3-1 supF^- (su^+) では検出できず、また 図 11 に示したように他の su^+ 菌 (b) CA5013 (su_1^+), (c) C600S (su_2^+), (d) Ymel (su_3^+), (e) BT63 (su_6^+) などに ϕ 80 野生株を感染させた場合にも検出できることから、 ϕ 80 野生株の遺伝子にあつたアンバー コドンが サブリッサー tRNA によるサブレスされて合成されたタンパクであることが確定されました。¹⁷⁾ このことは 1960 年 松代によて単離され、現在実験に用いられている ϕ 80 野生株が、元来その構造遺伝子中に、アンバー コドンをもつたものであることを示している。しかし ϕ 80 野生株は プラーフ形成効率や プラーフ形態で見る限り、 su^- 菌と su^+ 菌で差がないことから(表 - 3)この隠れたアンバー コドンは ファージ増殖に關係なく、 su^+ 菌では 34 K の新たなタンパクが 非必須遺伝子産物として产生されると考えられる。この 34 K のタンパクを バンド C (34 K) と命名した。図 11 の (a)(b) を比較すると su_3^+ 菌でこのバンド C (34 K) タンパクの出現に伴ない。それより分子量の小さい 31 K の D タンパクが su^- に比べて減少していることがわかる。これを量的に検討するため、このラジオオートグラフをデニシトメーターで定量化したの 34



[図11] SU^+ 菌での NTCの検出。

UVR⁻でない SU^+ 菌に UV 照射し、 ϕ 80野生株を感染させた。アラバマ

^{35}S -メチオニンでラベルし SDS-PAGEアリケート(電気泳動テク(15%))により

検討した。(a) 594(SU^-)、(b) CA5013 (SU^+)、(c) C600S

(SU^+)、(d) YMEL (SU^+)、(e) BT63 (SU^+)、各レーンの

左側は宿主タリルを示した(マウスを感染させていた)。UV 照射

射は $10800 \text{ erg}/\text{mm}^2$ である。

が図12と表-4である。表-4はデンシメトリーでの、各ピーコの面積とそれらの面積の和に対する、それぞれのピーコ面積の割合を%で示してある。表4のφ80野生株の段を比較すると明らかのように、φ80野生株に特徴的な major バンド A (su^- 23.7% / su_3^+ 22.8%)、バンド B (su^- 10.0% / su_3^+ 10.7%), バンド E (su^- 28.7% / su_3^+ 29.4%) また minor バンド D (su^- 10.9% / su_3^+ 8.4%) などは su^- 菌、 su_3^+ 菌とともにその割合に変化は見られなかった。しかし su_3^+ 菌では、バンド C (34K) の出現に伴ないバンド D の減少が著しい。 su_3^+ 菌でのこのバンド C (12.3%) とバンド D (16.4%) の面積の和は 28.6% となり、 su^- 菌でのバンド C の面積 (26.3) とほぼ等しくなった。このことから、バンド D のアンパウトをコードする遺伝子の終止コドンとして アンバーコドンがあり、それが su^+ 菌ではサブレスされ、より大きい 34K のバンド C が合成されていると考えられる。従ってサブレスする tRNA 量が十分でないので、この場合、バンド C (34K) とバンド D (31K) が両方存在するのではないかと考えられる。

図 11 に示したように用いた su^+ 菌の種類によってバンド C (34K) アンパウトの量が異なることも、そのような tRNA 量と関係しているかも知れない。

バンドA (su^- 7.1% / su_3^+ 8.7%), バンドB (su^- 2.2% / su_3^+ 4.0%),
バンドD (su^- 29.1% / su_3^+ 30.3%), バンドE (su^- 45.1% / su_3^+ 41.0%)

などは、量的にも su^- , su_3^+ で変化がなく、これらの中に sus620変異を起した遺伝子30の産物が含まれていないことがわかる。 su^- 菌では検出できず。

su_3^+ で出現するタンパクは前述のバンドC (34K) 以外に一本だけ見られる。

図-10-dの低分子量領域に見られるバンドがそれである。分子量は約 10 K 前後

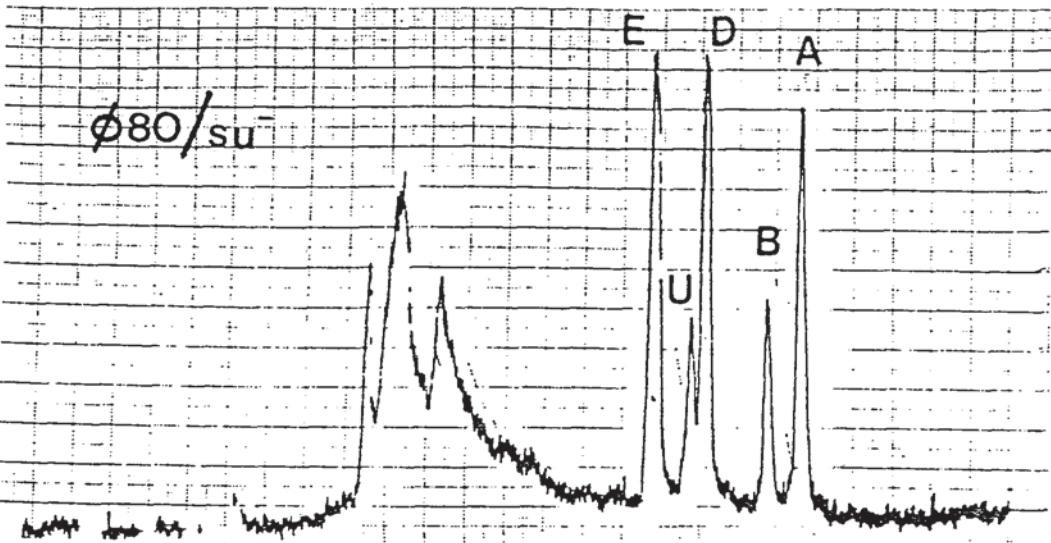
であると考えられる。この領域は電気泳動の先端にあり、また宿主大腸菌由来

のボリペプチドが混在するため判定がむずかしいが、他の実験と同じように

su_3^+ で濃くなるバンドが 10 K 前後に見られるため、このバンドが 遺伝子30産物である可能性はあると考えられる。

第三に、非常に注目すべき結果として、約80野生株のタンパクパターンと比較して、sus620変異株のパターンは、検出できたバンドの種類は同じであるが量的に非常に異なっていることがわかった。分子量の大きい3種のタンパクは sus620変異によって バンド A は 0.3~0.4倍、バンド B は 0.2~0.4倍、
バンド D は 0.6~0.8倍にそれぞれ減少した。これら3種のタンパクの減少の割合はほぼ等しく、彼らは一つのオペロンにコードされていると考えられる。バンド E のタンパクは逆に sus620変異により合成が 2.7~3.6倍に増加している。 37

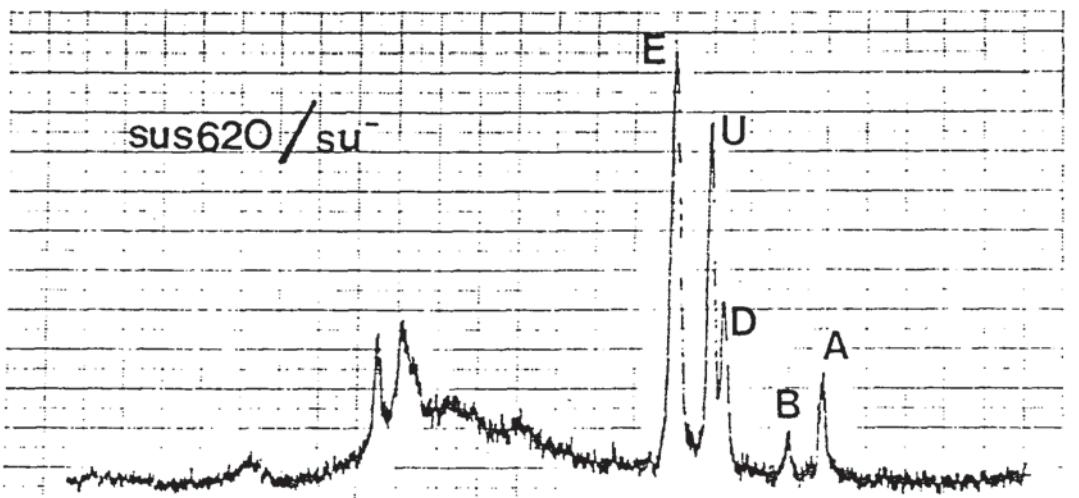
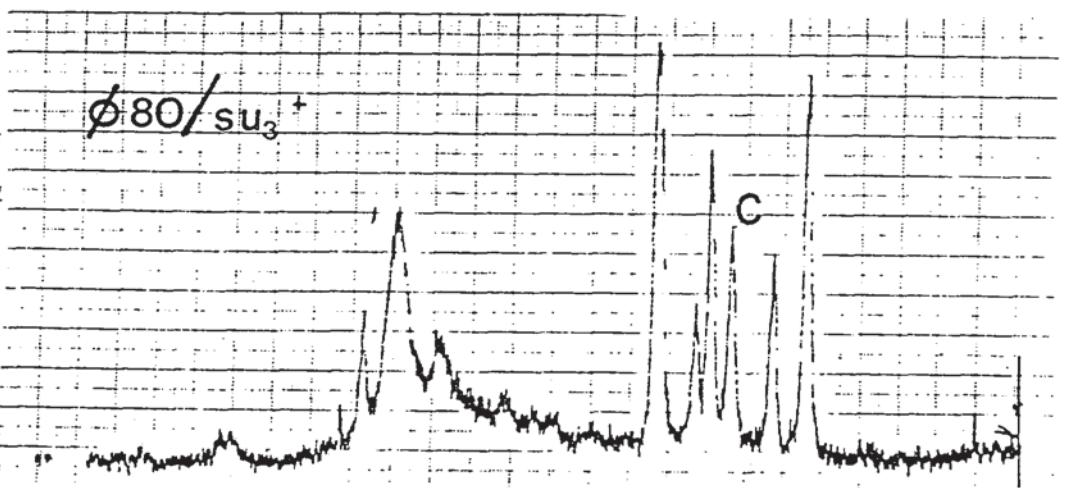
さらに図12ではバンドE(25K)とsus620変異で量的に余り変化してない(1.4~1.6倍)タンパクがあるがこれは1本のバンドではなく図27fに見られるように分子量がほぼ等しく泳動条件によって微妙に分かれてくる。バンドE(25K)とバンドV(26K)の2種類のタンパクから成ることがわかった。このうちバンドE(25K)は図27fのようにsus620変異で減少し、またバンドV(26K)は逆に増加するため、図12ではそれらの合計として見かけ上、変化なく見えたと考えられる。またsus620変異株ではsu⁻菌、su⁺菌とともに20Kの位置に新たなバンドが出現した。これをバンドWとした。以上のことからsus620変異が起こると、タンパクバンドの量に影響し、これによって増加するタンパク群(バンドU、バンドV、バンドWなどタンパク第一群と呼ぶ)と減少するタンパク群(バンドA、バンドB、バンドE、バンドD、バンドCなどタンパク第二群と呼ぶ)があることがわかった。これら2群のタンパクは2種の異なるオペロンから合成され、sus620変異をおこした遺伝子30の産物がこれらのオペロンの転写効率を支配していると考えられる。先に述べたsu⁺で出現するバンドCとそれと関連しているバンドDタンパクに注目すると、sus620変異によってバンドDタンパクの減少(0.8倍)とともにバンドCタンパクも減少(0.3倍)しており、これらがともにsus620変異 38



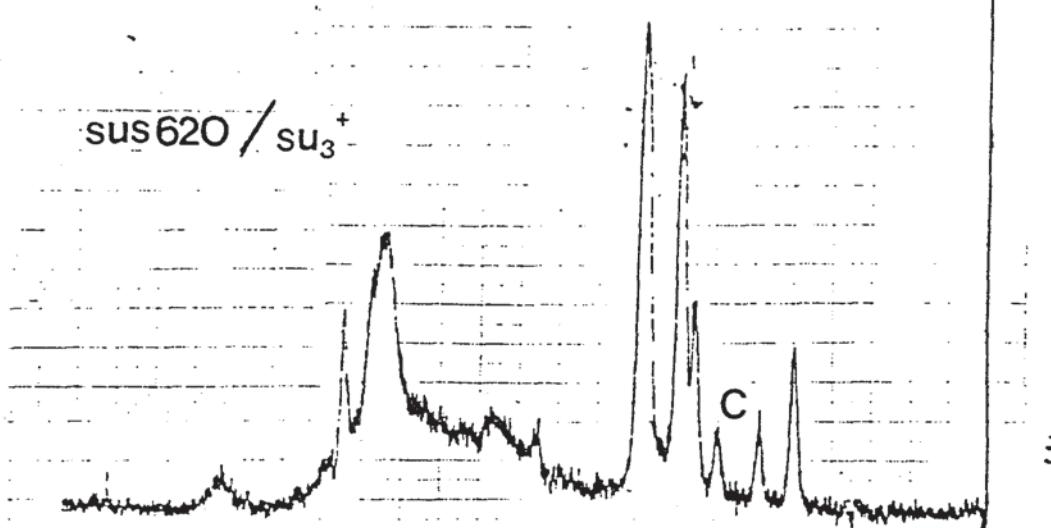
[図12]

$\phi 80$ 野生株と
 $\phi 80$ sus 620
変異株のタンパク
の電気泳動パターン

[図11]で得られた
ラジオオートラムを
デシントメーターで
測定したグラフで
ある。
泳動は図の右
から左に行なった。



sus 620 / su⁻



[表4] ϕ 80野生株と ϕ 80sus620の初期タンパクの量的比較

protein bands		E (V)	U	D	C	B	A	
mol.weight		25K(26K)	29K	31K	34K	40K	45K	total
ϕ 80wild	su^-	29.5 (28.7%)	11.2 (10.9%)	27.1 (26.3%)	-	10.3 (10.0%)	24.4 (23.7%)	103 (100%)
	su_3^+	25.8 (29.4%)	7.4 (8.4%)	14.3 (16.4%)	10.8 (12.3%)	9.4 (10.7%)	20.0 (22.8%)	87.5 (100%)
ϕ 80gene30	su^-	28.4 (45.1%)	18.3 (29.1%)	10.3 (16.4%)	-	1.4 (2.2%)	4.5 (7.1%)	61.0 (100%)
	su_3^+	x1.54 36.9 (41.0%)	x2.67 27.3 (30.3%)	x0.62 11.8 (13.1%)		x0.22 3.1 (3.4%)	x0.30 3.6 (4.0%)	
ratio		x1.39	x3.61	x0.80	x0.28	x0.38	x0.38	

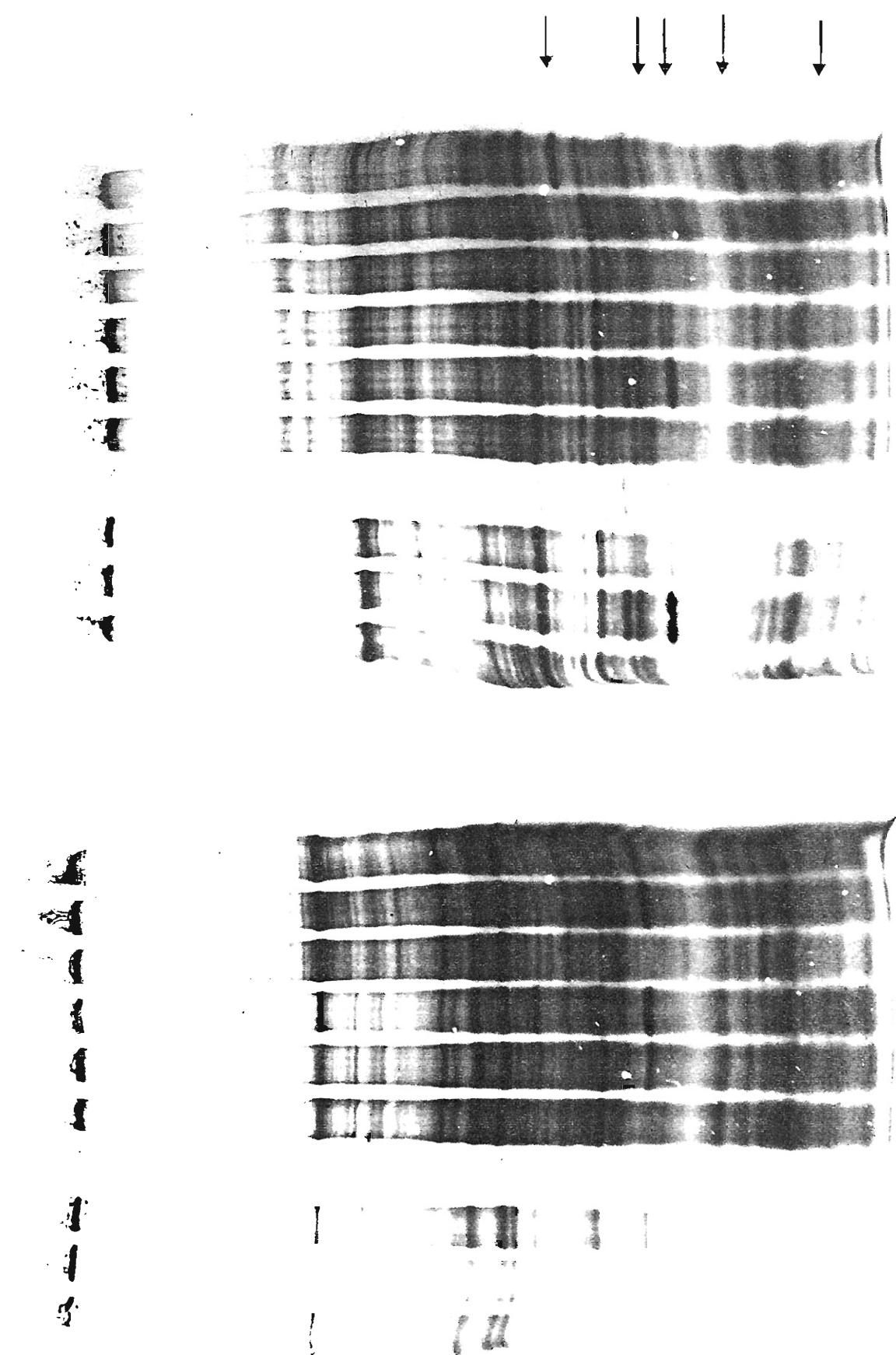
[表-4]の説明、図15のデンシトメーターで測定したグラフより、各ピークの面積を求めた。

数値の単位は $\times 10^{-1} \text{ cm}^2$ である。図10でもわかるように分子量 1万付近には宿主タンパクなどが広い帶を作っているため、量的比較は E バンド (25K) 上方にについてのみ行なった。従って 25K 以上のバンド、U, D, C, B, A についてのみ、ピーク面積を求め、その合計を 100% として各ピークの面積の割合を % で () 内に示した。 ϕ 80 sus620については ratio の後にそれぞれの宿主菌 (su^- , su_3^+) について、 ϕ 80 野生株のバンド割合との比を示した。

で減少するオペロンに属することを示しておる。バンドCとバンドDがアンバー
コドンで連なっている可能性を裏づけるものである。

このように UV照射大腸菌を用いて検出してきたタンパクが果して、正常な
UVを照射しない大腸菌にファージが感染した時にまと"のように発現して
いるかを調べたのが図 13 である。UV照射大腸菌の場合と同様に HF
カザミン培地で大腸菌 159 を培養し集菌して HF 基本培地に懸濁して
後、UVを照射せずに φ80 野生株、φ80SWS620 変異株を感染させて、図
に示した時刻に ^{35}S -メチオニンで 5 分間ラベルし、SDS ポリアクリルアミド
電気泳動法によりタンパクを分析した。この場合、宿主大腸菌への ^{35}S -メチオニンの
取り込みが多く、ゲルパターンは複雑になつたが、非感染菌のパターンと比較すると
UV照射大腸菌で見られた φ80 ファージに特異的なタンパクを識別することができた。
感染後、0 分、10 分、30 分、45 分、60 分、90 分にラベルした野生株を見ると、
UV照射大腸菌で検出してきた major のバンド (A, B, D, E) は、0~5 分で
既に出現し始め、感染後 10 分で最大になり、30 分を経過すると減少し、45 分
後には見られなくなった。その後 60 分後から、先の A, B, D, E とは異なる位置
にファージタンパクが検出でき、90 分後には 40 K, 27 K, 23 K, 20 K, 11 K
の新たな 5 種のタンパクの出現が明らかになった。このことは実際に

0', 10', 30', 45', 60', 90'



[図13]の説明、ファーニターハウス成の経時変化。

UVを照射していない大腸菌は ϕ 80野生株、 ϕ 80sus620変異株を感染させたときの結果。
(159)

これをUV照射菌の場合と比較した。方法は、UV照射菌の場合と、UV照射しないことを除いて全く同様である。図では3レンが1組になっていて、感染後、図の下に示した時間(5分間)間に 35 S-メラオニン $10\mu\text{Ci}/\text{ml}$ でラベルした。各レンについて左側はアーニーを感染させない場合の宿主タンパクのパターン、中央は ϕ 80sus620変異株を moi 50で感染させた場合のパターン、右側は ϕ 80野生株を moi 50で感染させた場合のパターンを示してある。0分と10分、45分と60分の間に標準としてUV照射菌での ϕ 80野生株のタンパクパターンを示した。感染後90分の ϕ 80野生株のタンパクパターンは矢印で示したバンドは、感染後60分から出現していくマージュ後期タンパクである。

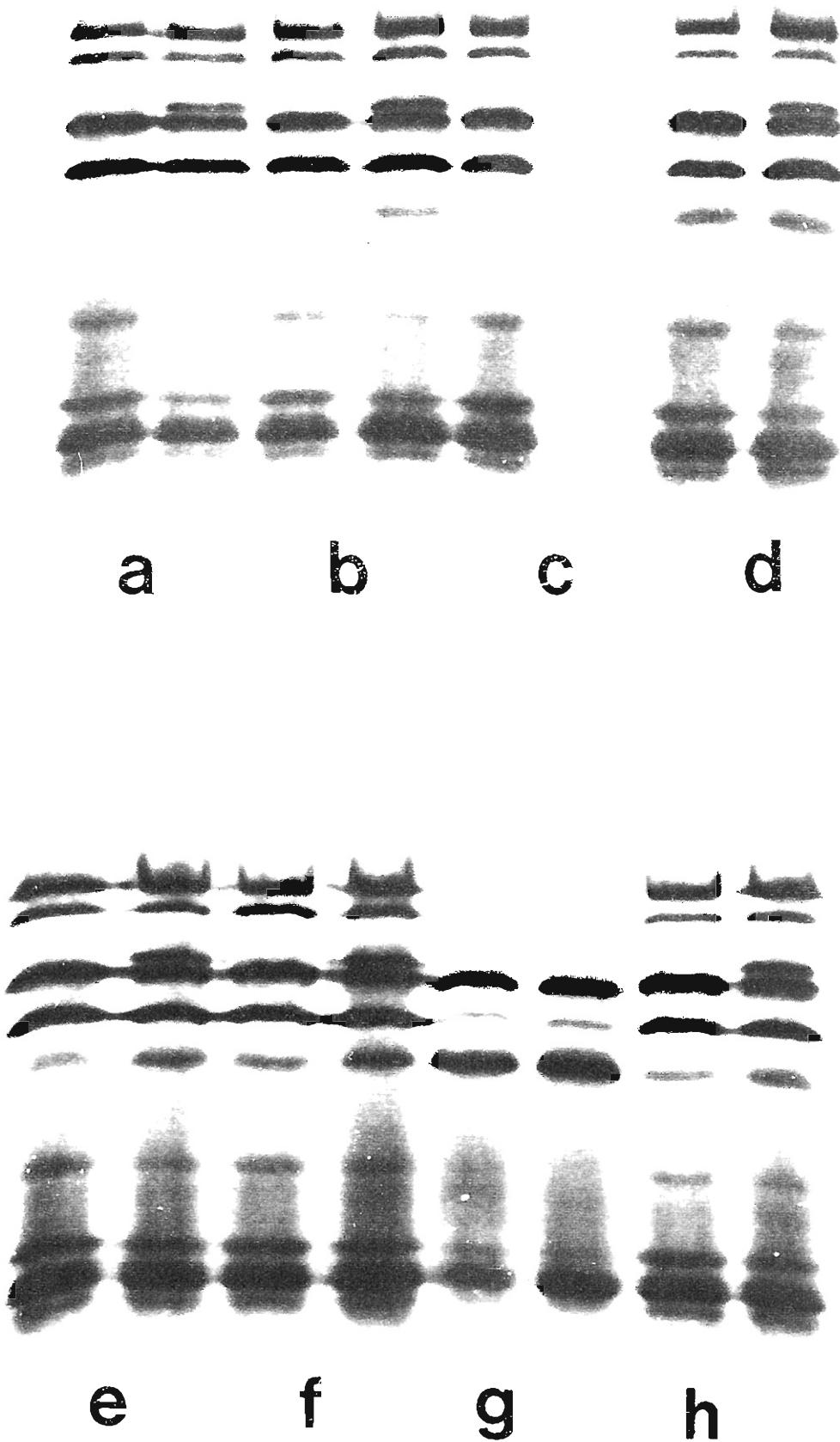
大腸菌にフージが正常に感染して増殖する場合にも、UV照射菌で見られた A, B, E, D のタンパクが同様に产生されていることを示している。そしてそれらの合成は、30分からいて停止し、別のタンパク分子種の合成にとて代わることから、それらは感染初期に特異的なタンパク分子種であると考えられる。一方 sus620変異株の場合、このような初期タンパクの出現はやや遅く、10分後で見られるようになり、30分、45分、60分と前述の独特なパターンを示し続けた。90分でこれらの合成がなくなるが、Φ80野生株で見られたような「新たにバンド」は出現しなかった。両者のこの経時変化は先に述べた mRNA 合成の経時変化とよく対応するものである。即ち sus620変異株では初期 mRNA 合成が長く続き、中期・後期 mRNA 合成が見られなかったことに対応する。UV照射大腸菌で検出できた「初期タンパク」が Φ80 遺伝子マップ上で「ここに位置づけられる遺伝子産物」であるか次に検討した。

(C) 初期タンパクの同定

(a) cI の右近傍にある複製に関する遺伝子領域 _____ Φ80 遺伝子
地図上でこれらの初期タンパクをコードしていると想えられる領域は、cI の近傍であるが、その中で、アンバー突然変異株の多く単離されている遺伝子 15, 14, 16, 17

について初期タンパクパターンに変化があるかどうか調べた。図 14 1=2 44

アフとその結果を示した。図14についてレーン(a)は遺伝子15のアンバー突然変異株であるsus326, (b)は遺伝子14と遺伝子15の間にマップされるアンバー突然変異株sus250, (c)は遺伝子14(入の遺伝子Pに相当)のアンバー突然変異株sus8, (e)は遺伝子16のアンバー突然変異株sus258, (f)は遺伝子17のアンバー突然変異株sus146, (d)(g)は約80野生株, (g)は遺伝子30のアンバー突然変異株sus620のタンパクパターンを示してある。各レーンの左側には宿主にsu⁻菌であるN3-1(su⁻)を用いた場合、右側はsu⁺菌であるN3-1supF⁻(su⁺)を用いた場合のパターンである。その結果、遺伝子15, 14, 16, 17のいずれかのアンバー突然変異株でもそのタンパクパターンは約80野生株のそれと異ならず、特定のバンドの消失は見られなかった。またsu⁺によって出現したのは前述の34Kに相当するバンドのみであり、他に新たなバンドの出現はなかった。よってUV照射菌で検出した初期タンパク群に、このような工の右近傍にマップされるDNA複製に関する遺伝子産物は含まれていなかつた。從てこれら複製に関与すると思われる遺伝子領域から合成されるタンパクは、バンドA, B, C, D, Eなどに比べて、元来その合成量が非常に少なく、この条件下では検出されないと考えられる。それがUV照射によるためでないことは図13のUV照射しない場合の経時変化の実験でも、新たなアーチ型のバンドが感染初期に出現しないことから示される。また図15の



30cl	15	14	16	17
sus	sus	sus	sus	sus
620	326	250	8	258 146

[図14の説明] CIの右近傍にある遺伝子のアンバー変異株のタンパクパターン

CIの右近傍にある遺伝子 15, 14, 16, 17 とそのアンバー変異株 sus326,

sus250, sus8, sus258, sus146 を上の図に示した。このようなアンバー

変異株のタンパクをUV照射大腸菌を用いて調べた。1-ン(a) sus326,

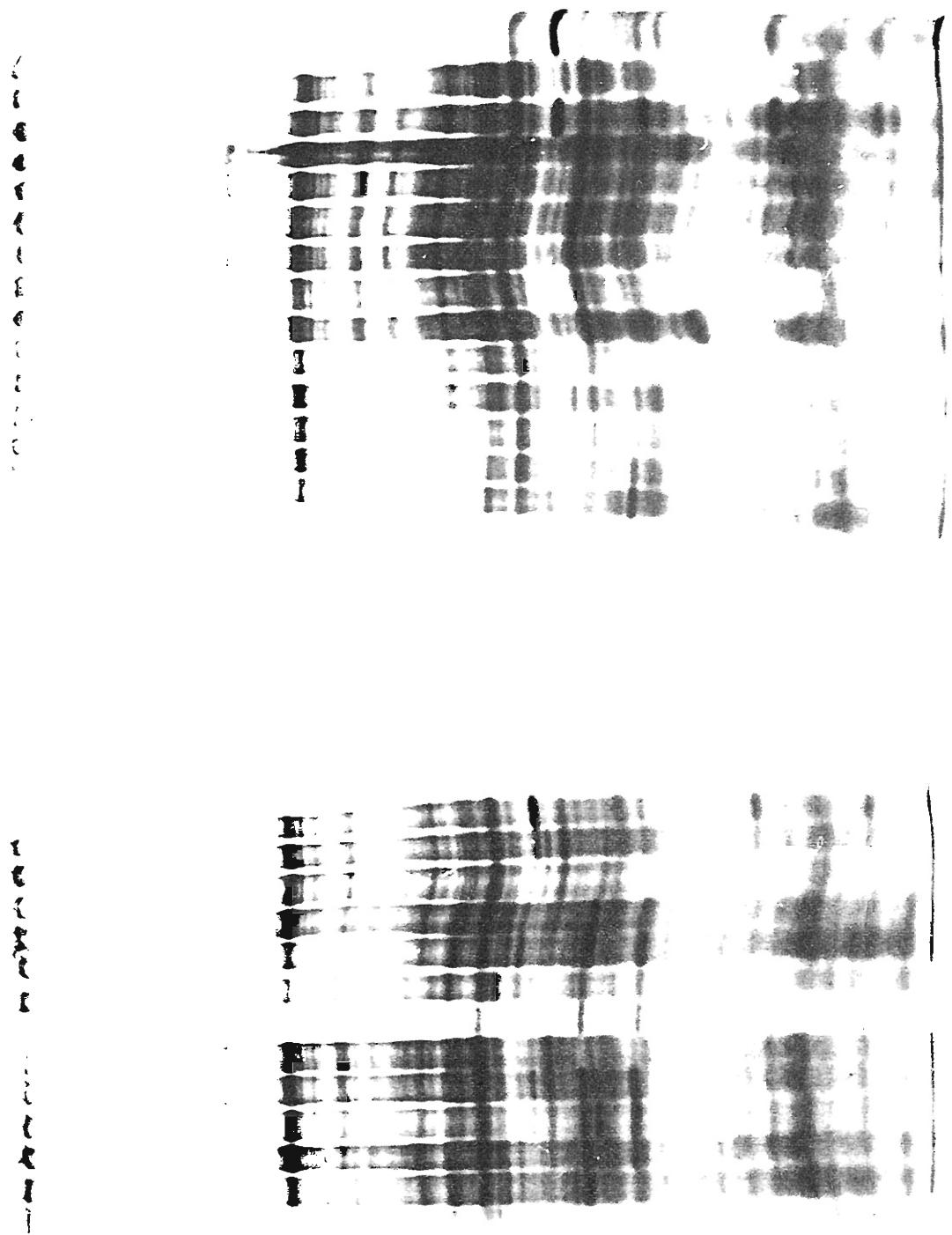
(b) sus250, (c) sus8, (d) (e) は sus620 野生株, (e) は

sus258, (f) sus146, (g) は sus620 のタンパクパターンである。

各レーンの左側はそれらのタンパクをsus菌 N3-1 に感染させた場合右

側は sus 菌 N3-1 ΔsupF^- に感染させた場合のパターンである。

[図15]



1 2 3 4 5 6 U1 2 3 4 5 6 U2 3 4 5 6 U3 1 2 3 4 5 6 U4 1 2 3 4 5 6 U5 1 2 3 4 5 6 U6 1 2 3 4 5 6 U7 1 2 3 4 5 6 U8 1 2 3 4 5 6 U9

〔図15〕の説明

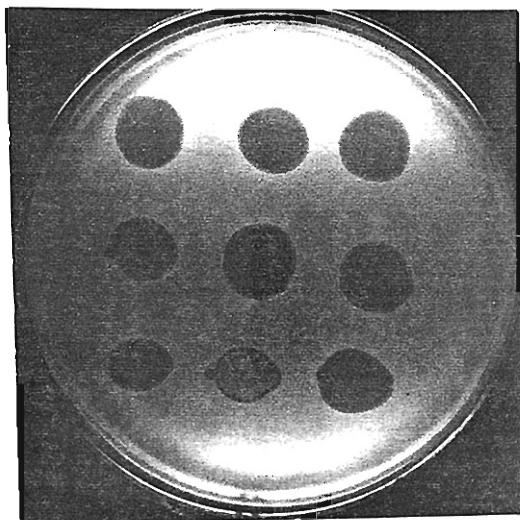
UVを照射せずに 1591は ϕ 80野生株、 ϕ 80sus 620 変異株を感染させ、ラベルしてタンパクを電気泳動で分析した。図15には (a) ϕ 80sus 620 変異株、(b) ϕ 80野生株 (c) フージを感染させり、三つの場合についてのタンパクを示した。各パターン (a), (b), (c) の内 1 は 感染後 0 分、2 は 10 分、3 は 30 分、4 は 45 分、5 は 60 分、6 は 40 分後ラベルされたタンパクである。U のレーンは UV 照射菌に ϕ 80野生株を感染させた時のパターンである。(d) は 各々のアンバー変異株を感染させた後、90 分後 35 S-メチオニンで 5 分間ラベルした結果である。(d)-1 は sus 146, (d)-2 は sus 258, (d)-3 は sus 8, (d)-4 は sus 250, (d)-5 は sus 326, (d)-6 は sus 620 を感染させた。 (d)-7 は ϕ 80野生株を感染させた後 90 分でラベルした場合、(d)-8) フージを感染させずに 90 分目にラベルした場合、(d)-9 は UV を 1 分照射後 90 分目 ϕ 80野生株を感染させ、90 分目にラベルした場合のタンパクノマターンを示している。

ように感染後60分から90分に新たに出現したタンパクを、このようなアンバー突然変異株は全く合成することができなかつたことから、60分以降には検出できたタンパクが複製に関与する遺伝子の直接の産物である可能性は低く、これらは後期の豆乳部または尾部タンパクであると考えられる。

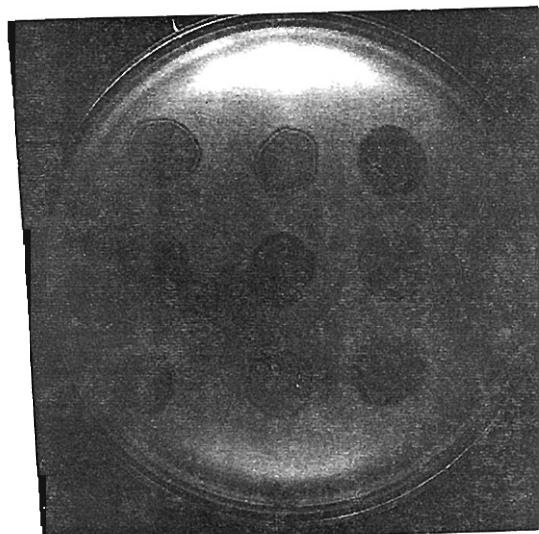
(b) immunity 領域

(ii) クリア変異株。次にこれらの初期タンパクをコードしている可能性のある遺伝子としてcI, cII 遺伝子がある。φ80cI 変異株としてcI₄が多く用いられるが、これはcI 遺伝子のアンバー突然変異がないため、タンパクバンドの消失が期待できないし、結果は示さないが実際、野生株と異ならなかった。cI, cII タンパクを同定する目的で、これらのアンバー突然変異株を単離させた。これらの変異株は su⁻ 菌ではクリアーブラーフを形成し、su⁺ 菌ではターピッド(turbid)なブラークを形成した。cI₄との相補性試験により、cI アンバー突然変異体であるcIam7, cIam8, cIam26 と、cII アンバー突然変異体である cIIamA, cIIamE に分けることができた。図16表5,6にこれらの性質を表わした。このようなクリア変異株をUV照射したsu⁻ 菌N3-1とsu⁺ 菌 N3-1supF⁻に感染させ、³⁵S-メチオニンでラベルした後、SDSゲル電気泳動法によりタンパクを分析したがφ80野生株のパターンと変わるものではなかった。(図17) よって major の初期タンパク質に cI, cII

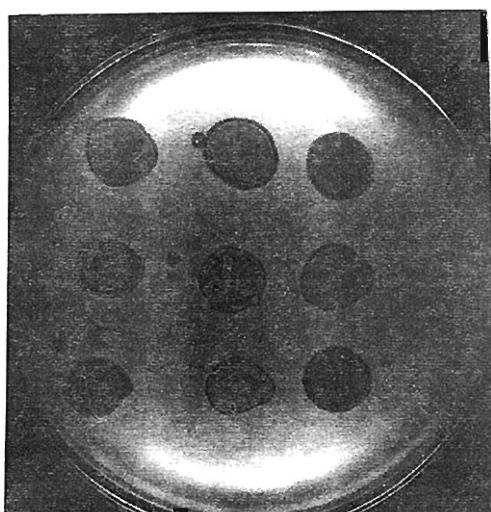
[図 16]



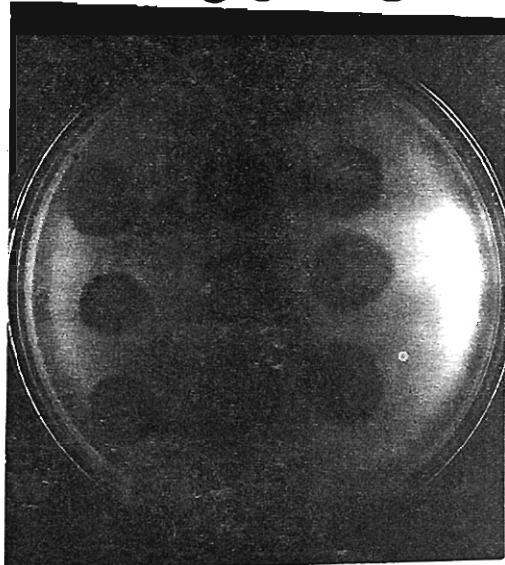
594



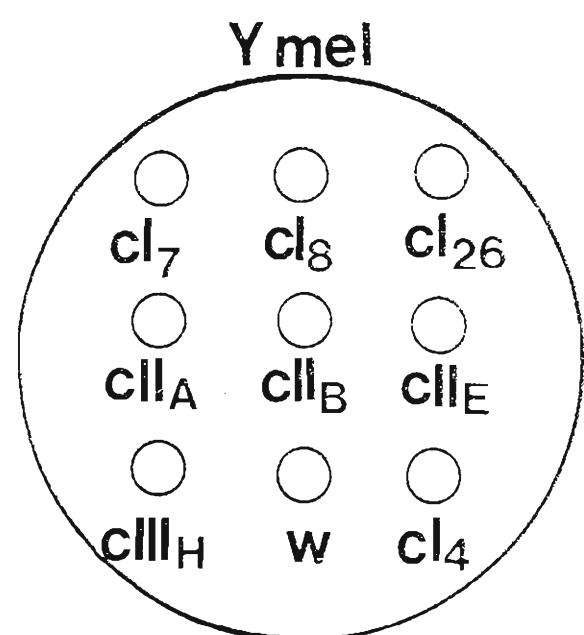
CA5013



C600S



B T 63



【図16】² 説明 クリアー アンバー 変異株の性質

図に示した大腸菌 594(su⁻)、CA5013(su₁⁺)、C6005(su₂⁺)、
Ymel(su₃⁺)、BT63(su₆⁺)をT入プレートにまき。その後、単離された
クリア変異株を約 10⁸/ml でスポットした。得られたクリア変異株は 594
(su⁻)菌上ではクリアであるが su⁺ 菌では表5、表6のようにタービッドに
なり。cI, cII, cIII のアンバー変異株であることがわかった。

[表5] $\phi 80c$ I アンバー 突然変異株

strains	$\phi 80c$ I amber mutants		
	cIam7	cIam8	cIam26
HfrH (su^-)	c	c	c
159 (su^-)	c	c	c
N3-1 (su^-)	c	c	c
CA5013 (su_1^+)	t	t	c
CA161 (su_2^+)	(t)	(t)	c
Ymel (su_3^+)	t	t	t
N3-1supF ⁻ (su_3^+)	t	t	t
BT63 (su_6^+)	c	c	(c)

種々の su^+ , su^- 酵を YAPL-トロスプレートに軟寒天とときこまき、約10%の

ブージをその上にスポットして、夜 培養後、クリアかタビットか判断して。

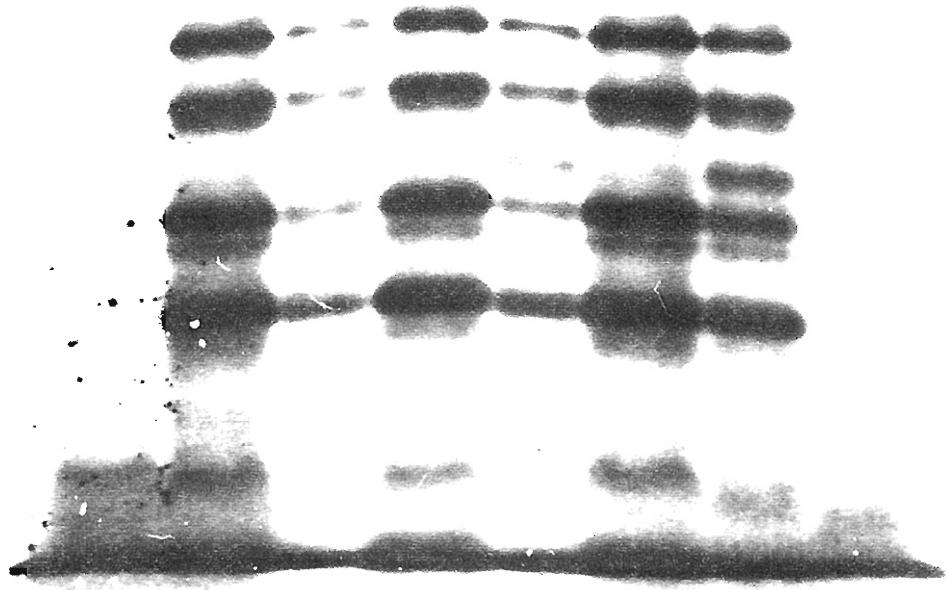
t: タビットスポット, c: クリアスポット。37°で培養して。

[表6] $\phi 80c$ II アンバー 突然変異株

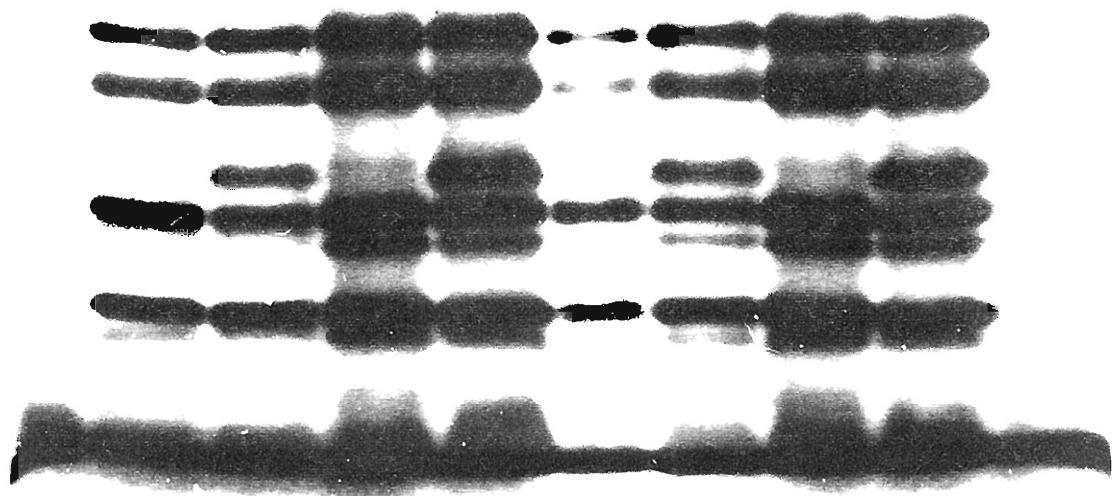
strains	$\phi 80c$ II amber mutants	
	cIIamA	cIIamB
HfrH (su^-)	c	c
594 (su^-)	c	c
CA5013(su_1^+)	t	c
CA161 (su_2^+)	t	t
Ymel (su_3^+)	t	c
BT63 (su_6^+)	t	c

[表5]と同様の方法で調べた。

[図 17]



Cl₇ Cl₈ Cl₂₆



cIII_H cII_A wild cI_E

[図17]の説明 cI, cIIタンパクの検出.

UV照射菌を用いてcI, cIIタンパクを可視する目的で、cIアンバー変異株

とN3-1 (su⁻) とN3-1supF⁻に感染させ、タンパクを分析した。方法は。

<材料と方法>に述べた。用いたアーニーはφ80C1amT, φ80C1am8

c1am26, cIIIamH, cIIamA, cIIamEで、φ80野生株と对照に用

いた。

などの遺伝子産物は存在せず、これらの合成レベルもやはり major の初期タンパクに比べて、非常に低いことがわかった。

(ii) $\phi 80cI\text{ts}G$ 溶原菌中のアーチタンパク合成。このような状態レベルの cI -Taq を同定する目的で、 $\phi 80$ の溶原菌に $\phi 80$ 野生株を UV 照射後、追加感染させ、できるタンパクを電気泳動法により分析した。入アーチでは ind^- を溶原化させた UV 感受性大腸菌に入アーチを感染させラベルすると、溶原化しているアーチ遺伝子から合成された cI リアレッサーにより追加感染したアーチの OL, OR のオペレーターが抑えられ、 cI - rex 遺伝子のみ転写されるためラベルは cI と hex タンパク (16) に取込まれることがわかつて。この場合 ind^- を用いるのは、UV 照射によって溶原化しているアーチが誘発されるのを防ぐためである。 $\phi 80$ の場合、 ind^- の代わりに $\phi 80cI\text{ts}G$ を用いた。 $\phi 80cI\text{ts}G$ は cI リアレッサーが温度感受性で 35°C 上で高溫による誘発を受ける。このアーチは同時にまた UV ind^- の性質ももつことが知られている。UV 感受性大腸菌 159 に $\phi 80cI\text{ts}G$ を 30°C 溶原化させ、UV 照射後、 $\phi 80$ 野生株および $\phi 80V_2$ を感染させ、 ^{35}S -メチオニンでラベルした後、タンパクパターンを調べた。図 18-a は非溶原菌 159 に $\phi 80$ 野生株を感染させた对照である。UV 照射の時間を 0 分、1 分、3 分、5 分、9 分と変えていくと、先に ^{14}C -ロイシンの取り込みで調べたように宿主

タンパク合成の低下が見られる。しかしUV照射時間が1分から9分にかけてアーチ由来のタンパクは宿主ほど減少せずクリアなバンドとして残った。次に ϕ 80cI_{ts}Gを159に溶原化させた菌に ϕ 80野生株を感染させたのが、図18-bである。

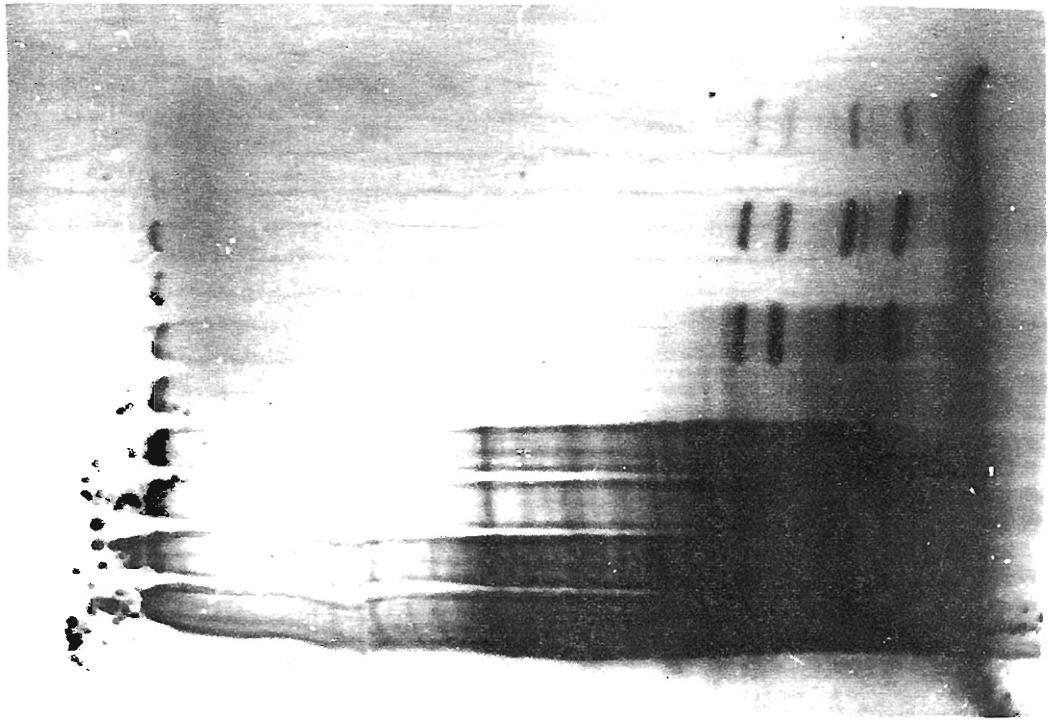
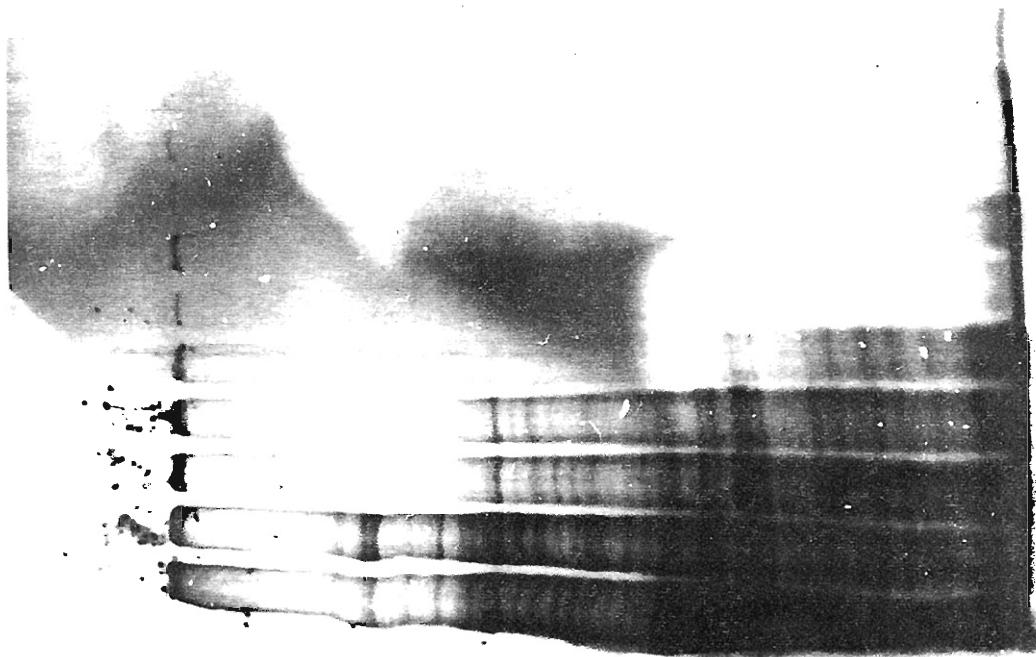
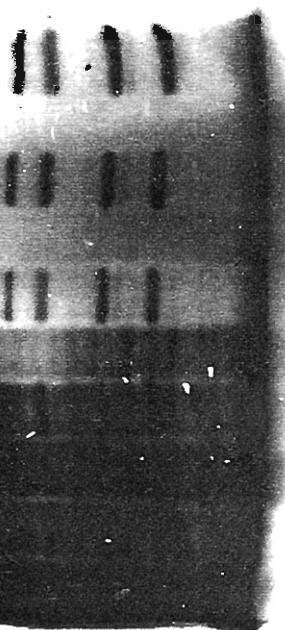
同様にUV照射量を増すと宿主タンパクの減少が見られたがアーチタンパクは検出できなかった。さらにもう一つの対照として、159の ϕ 80cI_{ts}G溶原菌に ϕ 80V₂を感染させたのが図18-cである。この場合は図18-aと同様に1分から9分間のUV照射でアーチタンパクが明瞭に残っているのがわかる。以上のことから次のことがわかる。第一にこの ϕ 80cI_{ts}Gを溶原化させた大腸菌159にUV照射(9分間まで)してもアーチタンパクは検出できず、溶原化してアーチが紫外線により誘発されてアーチ特異的タンパクを作ることはできないということである。第二にこの溶原菌中で ϕ 80野生株はポラーカーを形成しないが、それと対照して、アーチ特異的なmajorタンパク合成もなかった。これらのmajor初期タンパクは先に述べた2群とも、この溶原菌では抑制された状態にあることがわかった。この抑制はcIによると推察されるが、この抑制下に合成され続けているはずの抑制物質(cIか)自身は検出されなかつた。第三に、このような溶原菌にも増殖可能なビルレットアーチとて ϕ 80V₂があるが、これはアーチの初期遺伝子発現を調節するオペレーター構造が変化し、リバレッサーの結合を阻害する変異株と考えられる。このビルレット

a

$159 \leftarrow \Phi 80W$

55

0', 1', 3', 5', 9', 0', 1', 3', 5', 9'



b

$159(\Phi 80) \leftrightarrow \Phi 80W$

c

$159(\Phi 80) \leftrightarrow \Phi 80V2$

[図18] の説明 ϕ 80cI₅G 滅菌化 ϕ 80 が感染した場合合成されるタンパク

UVRA⁻ 大腸菌に ϕ 80cI₅G を溶原化させ、これに ϕ 80 野生株を追感染させて。

35 S-メチオニンでラベルされたタンパクを分析した。 (a) 非溶原菌 159 に ϕ 80 野生

株を感染させた。大腸菌は 0 分、1 分、3 分、5 分、9 分間それぞれ照射して、各 UV

照射の 1 コードについて、左側には宿主のターパクパターン、右側には ϕ 80 野生株を

感染させた場合の 1 コードである。 (b) ϕ 80cI₅G を溶原化させ、ついで 0 分、1 分

3 分、5 分、9 分間 UV を照射してから ϕ 80 野生株を m.o.i. 50 で感染、非感染

レ、タンパクパターンを分析した。 (c) ϕ 80cI₅G を溶原化させ、ついで 0 分、1 分

3 分、5 分、9 分間、それぞれ UV を照射してから ϕ 80 V₂ (ダブルレート) を m.o.i.

50 で感染させテベルセルをタンパクを分析した。

ファージφ80ITS Gの溶原菌に感染した場合には、ファージ特異的なタンパクは2群とも合成され、ビルレントファージのオペロンが先の抑制を受けないことを示している。この実験からも、溶原菌中でも合成されるのは必ずしもそれと類似したタンパクは検出されず、その合成レベルは major な初期タンパクに比べて非常に低いと結論される。図19には、minorバンドを検出するためのエクスプローラが溶原菌で検出できるバンドは描かれた。

(c) cI の左近傍にある粗換えて関与する遺伝子領域

(i) 欠失変異株の单倍性

以上の実験より、感染初期に出現する major タンパクは 2 群ともに cI, cII, cI 領域の左近傍の複製に関与する領域、後期の遺伝子産物でありことがわかった。したがってこれらをコードしている可能性がある領域は cI より左側のファージの粗換えて関与する遺伝子領域が残された。この領域の遺伝子はそれらが粗換えて関与し、正常な大腸菌では、これらの遺伝子がミスセニス、アンセンス、欠失などの変異を起こしても増殖できるが、他の遺伝子であるため、SUS⁺変異株は单倍性されていない。しかしこれが増殖可能なファージを単離し、それらのタンパクパターンを比較することは可能であるので、この領域の欠失変異株の单倍性を試みた。

入や φ80 ファージは EDTA などのキレート剤の存在下で熱処理するとファージの不活性化が起こることが知られている。これはキレート剤によりファージ頭部タンパク構造

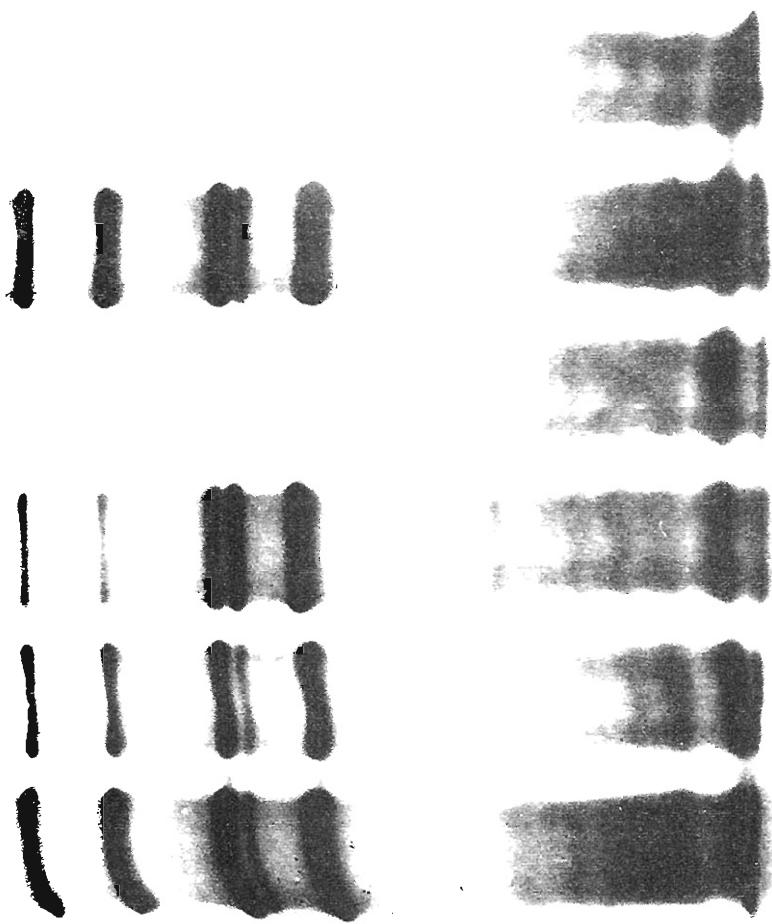
ΔA sus620

ΔA 4

mm

sus620 wild

V_2



[図19]。説明、 $\phi 80$ cItsGの溶原菌に種々の $\phi 80$ 変異株を感染させた場合

合成されたタンパクのパターン

$\phi 80$ cItsGの溶原化した大腸菌と、非溶原菌159は、 $\phi 80$ 野生株 $\phi 80$ sus620、

$\phi 80$ V₂(ビルレント)、 $\phi 80$ A4、 $\phi 80$ A4sus620を感染させ、合成されたタン

パクをラベルケルトヒー^{35S}でラベルし、大腸菌、溶原菌、非溶原菌ともにLVを3分間振

射した。ファーシーを感染させず、両方の菌の対照を中心(一の印)に示した。

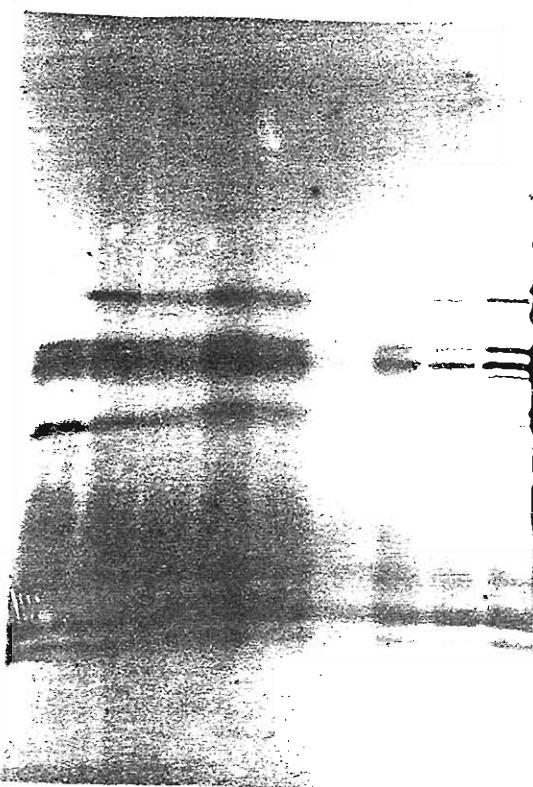
各試料とも左側に非溶原菌で、右側に $\phi 80$ cItsG溶原菌でのファシ

タンパクパターンを示した。 35 S-メチオニンによるラベルは感染後20分で行なった。

がくすれ、内部のDNAが外に出るためである。ところが欠失変異株の場合、内部のDNA鎖が短かいため、EDTA熱処理に対して、野生株より安定な性質をもつ。この方法で約80%野生株より spontaneousに出現した欠失変異株を選択した。

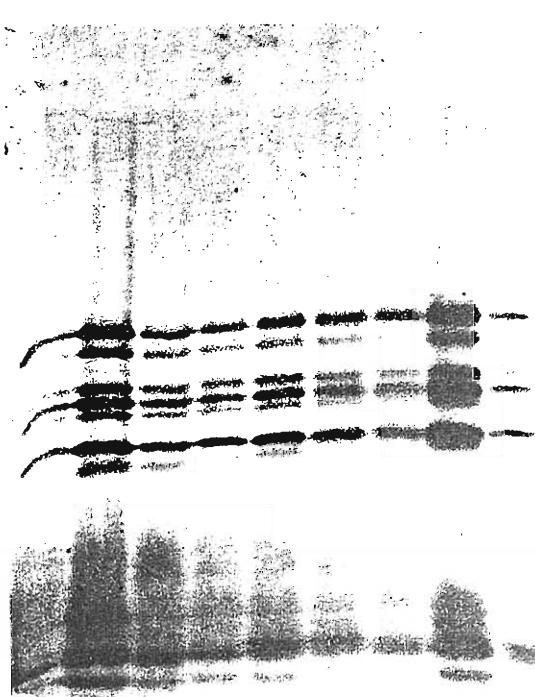
約80%野生株 ($5 \times 10^{10}/\text{ml}$) を 20mM EDTA, 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で 10^2 希釈し ($5 \times 10^8/\text{ml}$)、これを 60° 、1時間熱処理を行なった。この処理によりフージ浓度は 6×10^{-5} 低下した。生き残ったフージを C600S とともに T1 phage-plate において一度増殖させ、T1 phage-plate で抽出して ($1 \times 10^{11} \text{ フージ}/\text{ml}$)。これをもう一度、20mM EDTA, 60° 1時間の熱処理を行なうとフージ浓度は 8×10^{-3} 低下した。こうして2回のEDTA熱処理に耐えたフージを C600S とともに T1 plate にまき、単一のプラークを単離した。これらのフージが組換え領域の欠失変異株であるかどうかは 大腸菌 C600S recA⁻ 変異株で増殖できるか否か (REC 現象) によってある程度判断できる。单一にしたフージを C600S と C600S recA⁻ 菌をそれぞれ、また T1 phage-plate にせん別し、 37° で一晩培養後、フージ増殖を比較した。单離したフージはすべて C600S で増殖するが、C600S recA⁻ 上では、その phage-plate 形態、増殖によって 5つのグループに分かれることがわかった。全部で 186 個の phage-plate は (i) タイプ A, タイプ B で増殖がよい 103 個、(ii) タイプ C, クリヤーで増殖がよい 40 個、(iii) タイプ D, 非常にクリヤーで増殖がよい 23 個 (iv) タイプ E, 増殖が悪い 18 個、(v) タイプ F, C600S

recA⁻では増殖できない 2個 の *recA* が発見された。この 5つのタイプからそれぞれ約 101 回のアーチを選び、それらを UV 照射大腸菌 N3-1 supF⁻ (*su3*⁺) に侵染させて、タンパクパターンを調べたところ 図 20 のように分った。タイプ B は φ80 野生株のパターンと同じであったが、その他の タイプ A, C, D, E, についてはそれぞれ独自の欠失型パターンを示すアーチが含まれていた。これらの新たに単離された欠失変異アーチを 図 20 のように $\Delta 5, \Delta 6, \Delta 7, \Delta 8$ とそれぞれ命名した。既に φ80 欠失変異株としては、山岸らにより単離された $\Delta 4$ 、今井らにより単離された $\Delta 3$ が知られている。また欠失とともに大腸菌のトロフトアンオペロンの組込まれた φ80_pφp 190R などについても、そのタンパクパターンを 図 21 に示した。まず 図 21・b は φ80 野生株のタンパクパターンであるが分子量の大きい方から A (45K), B (40K), C (34K), D (31K), E (25K), V (26K) と並んでいる。A, B, C, D, E は第一タンパク群、U, V, W は第二タンパク群に属している。新たに単離した欠失変異株 $\Delta 5$ は得られた中で最もタンパクバンドの欠失の少ない株で、バンド E とバンド B を同時に欠失していた。次に $\Delta 6$ はバンド E, B の他にバンド A が消失し、それより分子量の約 3000 グルтенぐらい小さい位置 (42K) に新たなバンドが出現した。このバンドは、バンド A が欠失変異により約分子量 3000 のフラグメントを失なったものであると考えられる。このバンドを A' と命名する。 $\Delta 7$ はバンド E, B, と A を全く欠失した

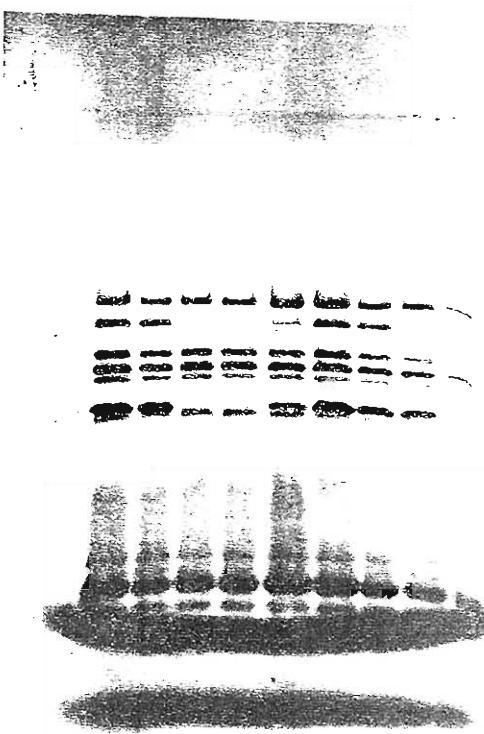


A

▲

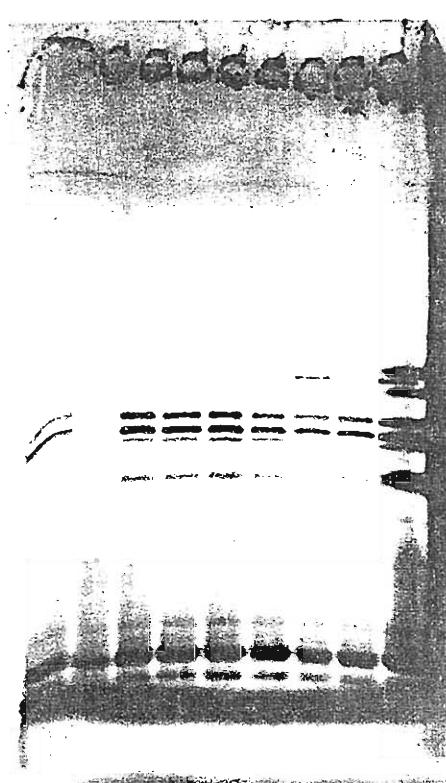


B



C

▲



D

▲

E

▲

[図20] の説明 欠失変異株のタンパク分析

EDTA 熱処理

単離し C600SrecA 上でのプロテイン形態によつて A, B, C, D, E に分類

した欠失変異株を UV 照射した大腸菌 N3-1supF⁻ (su₃⁺) に感染させ、³⁵S-

メチオニンでラベルした後、ゲル電気泳動でタンパク区分析した。方法は

<材料と方法>に述べたが、この場合、吸着条件を変えた。フージの種類

が多いため、 $10^{12}/ml$ のカ倍のフージを用意することはむずかしい。それで

フージ吸着は HF 基本培地ではなく、T₁ バッファーで行なつた。美國

の大腸菌 N3-1supF⁻ を T₁ バッファーで洗つた後、 $3 \times 10^8/ml$ の濃度

に合わせ UV を照射した。各種フージのプロト溶菌液 ($\approx 5 \times 10^9/ml$)

を T₁ バッファーで 200 倍希釈したもの 1 ml に、UV 照射大腸菌 0.1 ml ($3 \times 10^9/ml$)

と 10 倍濃度の HF-20A(ミ) 取培地 0.1 ml, $10 \mu Ci/ml$ の ³⁵S-チオニンを加えて

20 分間ラベルした。このとき m.o.i. は 1 以下である。この後の操作は <材料

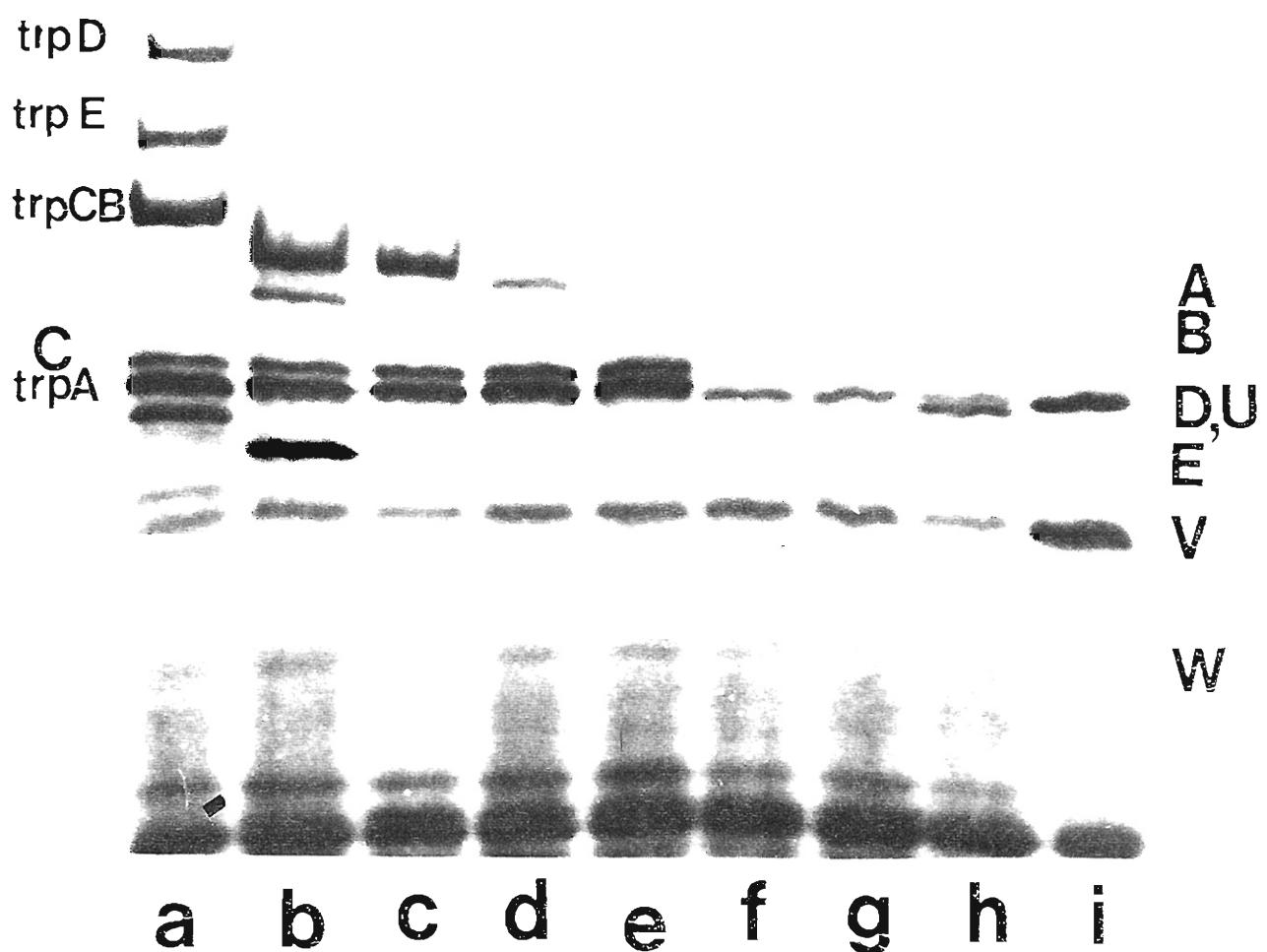
と方法> と同じである。A はタイプ A のフージを、B はタイプ B, C は

タイプ C のフージ、D はタイプ D のフージ、E はタイプ E のフージのタン

パクパターンを示した。未印は特徴的なタンパクパターンをもつフージについて

単離したものである。

変異株であった。△8はバンドE,B,Aの他にCとDのバンドを欠失していた。バンドCの消失とともにバンドDも消失していることから、両者は非常に近い位置にコードされている可能性が高く、前に述べたようにバンドCとバンドDはアンバーコードンをはさんでコードされていると考えられる。△4, △3のタンパクパターンは△8とほぼ同じである。すなわち バンド E, B, A, C, Dを消失し、U, V, (W) のタンパクを残している。しかし△3は新たに分子量が約28,000のタンパクがあり、△8には分子量約22,000くらいのタンパクが消失できた。これらはバンドDのフラグメントであると考えられる。これらをバンド D' (28k), バンド D'' (22k)と命名する。このようにEDTA熱処理によって得られた消失変異株はそれぞれバンド E, B, A, C, Dなどのタンパクを消失していることがわかったが、バンド U, V, (W)などのタンパクは消失しなかった。U, V, Wなどのバンドを消失する変異株は、EDTA熱処理を65°, 70°に上げても、Φ80_PSus₃⁺など長いDNAを持つフージから選択しても得られなかった。消失する E, B, A, C, Dが前述のタンパク第1群に属し、消失しないタンパク U, V, Wが第2群に属することは、先に述べた二つのオペロンの存在することを強く支持するものである。入フージのように組換えに関与する遺伝子がオペロンを形成していく方向性に転写されるとすれば、第一群のタンパクは遺伝子地図上で 図22 のようにマップされる。そして第二群のタンパクはそれらの右に存在すると考えられる。図21-i にはsus620変異株のパターンを示し

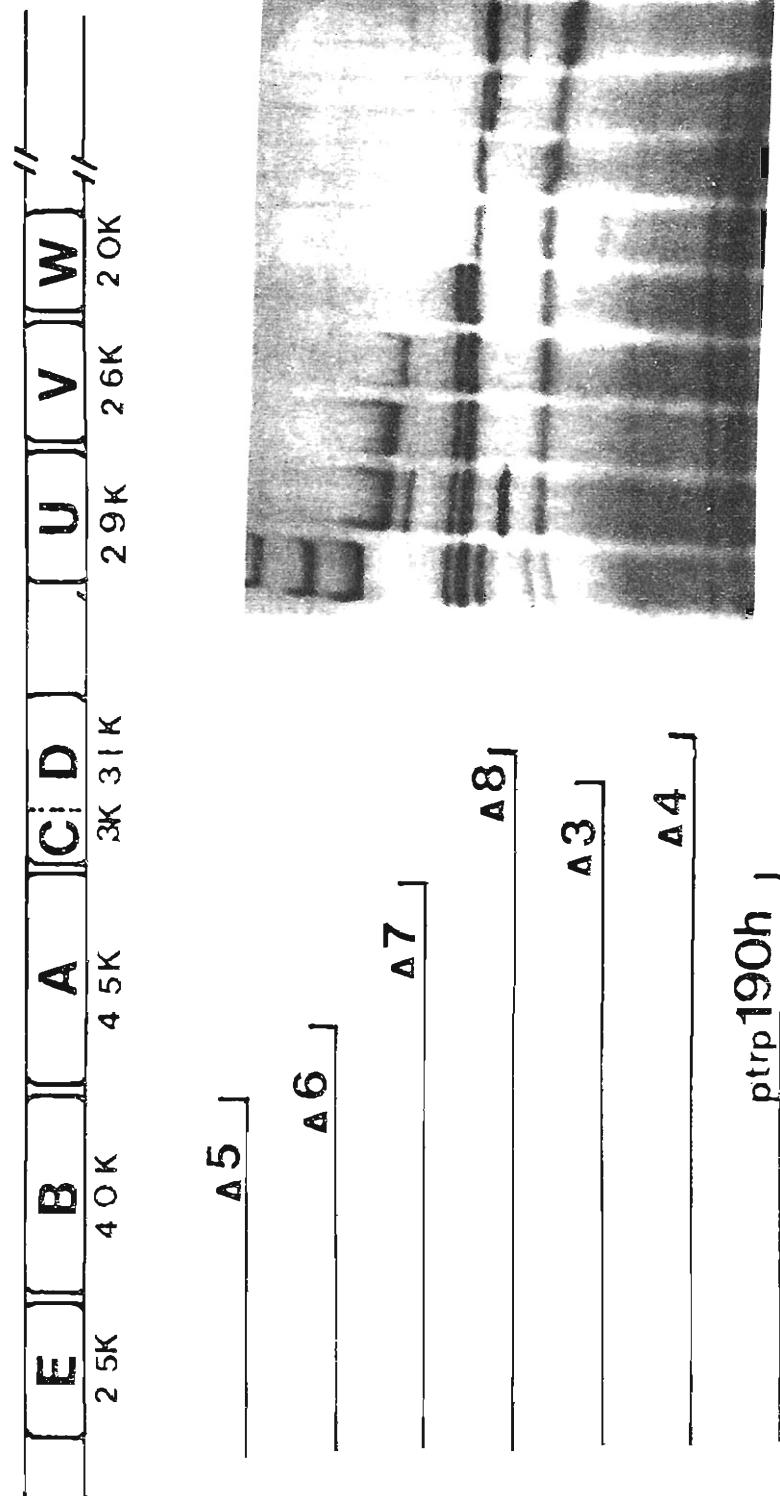


[図21] 次代変異フージのランゲルヒーリング

図22で得られた特徴的なランゲルヒーリングを複数株のフージ変異株と増殖させ
再び、HF-培地でラベルして得た標的詳細を検討した。(a) ϕ 80
 λ trp190^R, (b) ϕ 80 野生株, (c) Δ 5, (d) Δ 6, (e) Δ 7, (f) Δ 8
(g) Δ 4, (h) Δ 3, (i) ϕ 80sus620 変異株と大腸菌R-1supF⁻(su_G⁺)
に感染させた。

[FIG 22]

Deletion mutants of ϕ 80



l90 w Δ5 Δ6 Δ7 Δ8 Δ4 Δ3 sus
h 620

[図22]の説明、タンパクのマッピング

[図21]で得られた欠失のパターンより、それらの遺伝子の配列を

決定した。黒線の部分は、その箇所が失なしていることを示している。

バンドCとDには、その間にアンバーコードがあり、統合して合成されるとCバンドに現ることを表わしている。

たが、△3, △4, △8 に似ていることがわかる。また $\phi 80$ p_{trp} 190R は、バンド E, B, A を明らかに失っているが、バンド C, D は保持されていて、△T に相似していた。それらの他にトリプトファンオペロンの遺伝子産物であると思われる新たなバンドが検出できた。

65K バンド ($trp\ D$ に相当), ²²⁾ 60K バンド ($trp\ E$ に相当), ²²⁾ 46K バンド ($trp\ C, B$ に相当), 29K バンド ($trp\ A$ に相当) などである。

(2) 欠失変異株の性質

得られた欠失変異株について粗換算に関する

いくつかの性質を調べた。

(1) fec 現象 入アーチでは粗換算に用いられる遺伝子群の中で red 遺伝子とそれに隣接する 2 遺伝子に突然変異が起こると, $rec\ A^-$ の大腸菌では増殖できない。この現象を fec と呼んでいるが、 $\phi 80$ 欠失変異株にも $rec\ A^-$ 菌で増殖できないものがあり、 $\phi 80$ には入の red, 2 遺伝子に相当するものがあることを示している。表 7 に C600S 大腸菌でのプラーカ形成効率を 1 とした場合の、C600S $rec\ A^-$ 菌ごとの効率を示した。△3, △4, △8, $\phi 80$ p_{trp} 190R などは C600S $rec\ A^-$ へのプラーカ形成効率が 10^{-3} 以下であり、fec⁻であった。一方△5 はその比が約 0.8 であり、fec⁺であった。興味あることに△6, △7 はともに $rec\ A^-$ 菌でもプラーカは約 0.2 の割合で形成したが、プラーカが非常に小さくピンホールドットのようであった。このことは欠失の程度と fec 現象が直接関係しており、タンパク バンド A, 又は C, D が、red, 2 のいずれかに相当すると考えられる。

(b) red 遺伝子 入の red 遺伝子はエキソヌーカレアーゼと β という二つの遺伝子から成っており、いずれか変異しても、大腸菌 pol^- 株では 増殖できない。 $\phi 80$ についても red 遺伝子の存在は知られており、山口は redA と redB の二つのグループにその変異株が分けられ、redBの方がエキソヌーカレアーゼをコードしていることを示した。単離した欠失変異株についても、 $polA^-$ 大腸菌 N6-11 での増殖を調べ、表7に示した。いずれの変異株も red⁻であることがわかった。さらに redA⁻である red12 変異株、redB⁻である red42 変異株との相補性試験を行なった。L-プロスで培養した大腸菌 N6-11 ($polA^-$) を集菌し ($1 \times 10^8 / ml$)、これに相補性を調べる二種のアーニをそれぞれ m.o.i. ちで吸着、感染させた後、L-プロスで 10^3 希釈し、それを 37°、150 分振盪培養後、594 及び $polA^-$ 菌 N6-11 上でアーニ濃度を測定した。(表8) その結果、redA⁻である red12 と redB⁻である red42 は明らかにコンフリミントしたが新たに単離した $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 7$ 、 $\Delta 8$ 及び $\Delta 3$ 、 $\Delta 4$ 、 $\phi 80_{ptrp}$ 190f は red12、red42 のいずれともコンフリミントしなかつた。このことは高いた欠失変異株がすべて redA、redB の両方の遺伝子を欠失、または機能できない状態に在っていることを示している。

また、redB 遺伝子はエキソヌーカレアーゼをコードしていることが知られているので、これらの欠失変異株について、エキソヌーカレアーゼ活性を調べた。活性は C.M. Radding の

[表 7] 欠失変異株の recA^- 菌, polA^- 菌での増殖 (fec, red)

	C600S recA^- (1/C600S)	N6-11 polA^-
$\phi 80\text{wild}$	0.65	0.23
$\phi 80\text{red12(A)}$	1.0	$< 10^{-3}$
$\phi 80\text{red43(A)}$	0.73	$< 10^{-3}$
$\phi 80\text{red22(B)}$	0.73	$< 10^{-3}$
$\phi 80\text{red42(B)}$	0.82	$< 10^{-5}$
$\phi 80\Delta 3$	$< 10^{-3}$	fec^- $< 10^{-5}$
$\phi 80\Delta 4$	$< 10^{-3}$	fec^- 3×10^{-3}
$\phi 80\Delta 5$	0.72	fec^+ $< 10^{-3}$
$\phi 80\Delta 6$	0.21	fec^\pm $< 10^{-3}$
$\phi 80\Delta 7$	0.31	fec^\pm $< 10^{-3}$
$\phi 80\Delta 8$	$< 10^{-3}$	fec^- $< 10^{-5}$
$\phi 80\text{ptrp190h}$	$< 10^{-3}$	fec^- $< 10^{-5}$

単離した欠失変異株や $\phi 80\text{red}^-$ 株を, C600S recA^- と N6-11 polA^- とを

比較し, C600S での効率を 1.0 として, recA^- 菌, polA^- 菌でのプロト

交効率を測定した。Δ7, Δ7, および Δ6 のプロト交効率は C600S の約 2~3 割で

あるが、そのプロト交効率は非常に小さい point であるので fec^\pm と 1 だ。

[表8] 欠失変異株と red A⁻, red B⁻との相補性試験

	red ⁻	complementation		
		control	red12(A)	red42(B)
φ80wild	3800 (1230)	5700 (1000)	2280 (700)	
φ80red12(A)	320 (0)	310 (0)	7560 (110)	
φ80red42(B)	209 (0)	6000 (40)	242 (0)	
φ80Δ8	740 (0)	270 (0)	700 (10)	
φ80Δ7	1280 (4)	564 (0)	964 (14)	
φ80Δ6	2360 (0)	650 (0)	1000 (0)	
φ80Δ5	832 (0)	390 (4)	572 (0)	
φ80Δ4	660 (0)	384 (0)	800 (4)	
φ80Δ3	1180 (0)	890 (0)	1270 (20)	
φ80 pptrp190h	167 (0)	334 (0)	380 (0)	

実験の詳細は本文参照。大腸菌 N6-11 polA⁻ 中で各マージをさせられ。

増殖させ、希釈後、C600S および 594 上でカバーリングを測定した。これが対照

である。カッコ内には N6-11 polA⁻ 上で測定したカバーリングを示してある。この数は

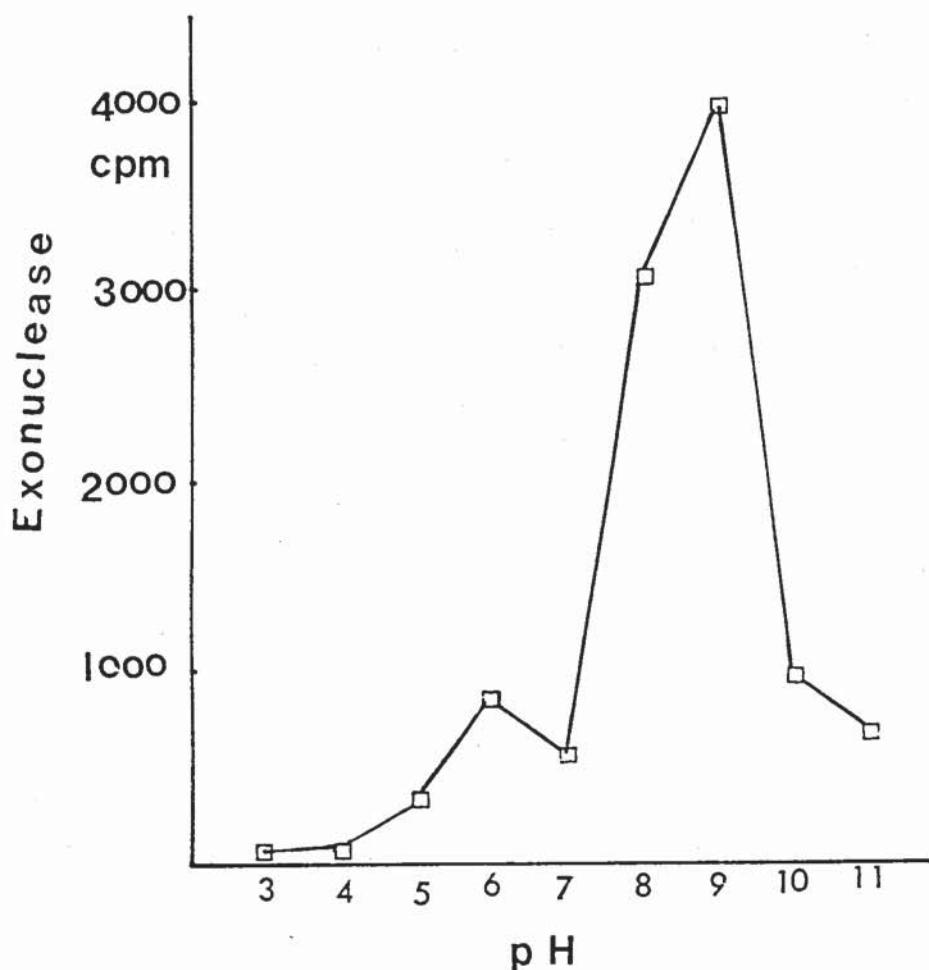
相補性を調べる二種のマージ間の組換え体の出現頻度を表している。次に

red12(A) または red42(B) を加えて、polA⁻ 菌内でマージ増殖を調べた。

red12(A) と red42(B) は互に相補性があるが、その他の欠失変異株

は red12(A) と red42(B) とも相補性がないことがある。

方法に従て測定した。 ^3H -チミンでラベルした大腸菌 594 Thy⁻のDNAを Smith, A. 法で精製し、基質に用いた。0.2 ml の 0.07 M グリシン緩衝液 (pH 3~11) に ^3H ラベルしたDNA 10 μl ($95 \mu\text{g DNA/ml}$, $7 \times 10^3 \text{ cpm}/\mu\text{l}$)、大腸菌 mRNA 5 μl (10^{-5} M)、フージ溶菌液 100 μl を加えて、37°で 1 時間反応を行なった。氷冷して反応を止めた後、0.2 ml の牛胸腺DNA (0.25%) と 0.5 ml の過塩素酸 (1.75%) を加えて 5 分間静置した。高速遠心で沈殿 LT-DNA を除き、上清 0.5 ml を Triton X-100 - Toluene (1:1) の系に加えて、液体シテレーションカウンターで放射活性を測定した。エキソヌクレアーゼの至適pHは図 23 のようであり、pH 6 と pH 9 に二つのピークを形成したが、pH 6 の小さいピークの活性はエキソヌクレアーゼの不活性な red B⁻ 変異フージ red 42, red 22 でも野生株と同じ程度の活性を示すことから、フージ由来のものではないと考えられる。pH 9 で ϕ 80 野生株の溶菌液中に含まれるエキソヌクレアーゼ活性を時間を追って測定し、約 2 時間までは直線的に反応が進行することがわかった (図 24)。この系を用いて、種々の欠失変異株の C600S に感染後 150 分の溶菌液に含まれているエキソヌクレアーゼ活性を測定した。単位は 1 時間あたり放出する放射活性量で評価。反応に用いた溶菌液のフージ濃度を 約 $1 \times 10^8/\text{ml}$ で一定あとと仮定した。表 9 にその結果を示した。red A に属する変異株 red 12, red 43 は ϕ 80 野生株とほぼ同程度のエキソヌクレアーゼ活性を示したが、red B に属する変異株 75



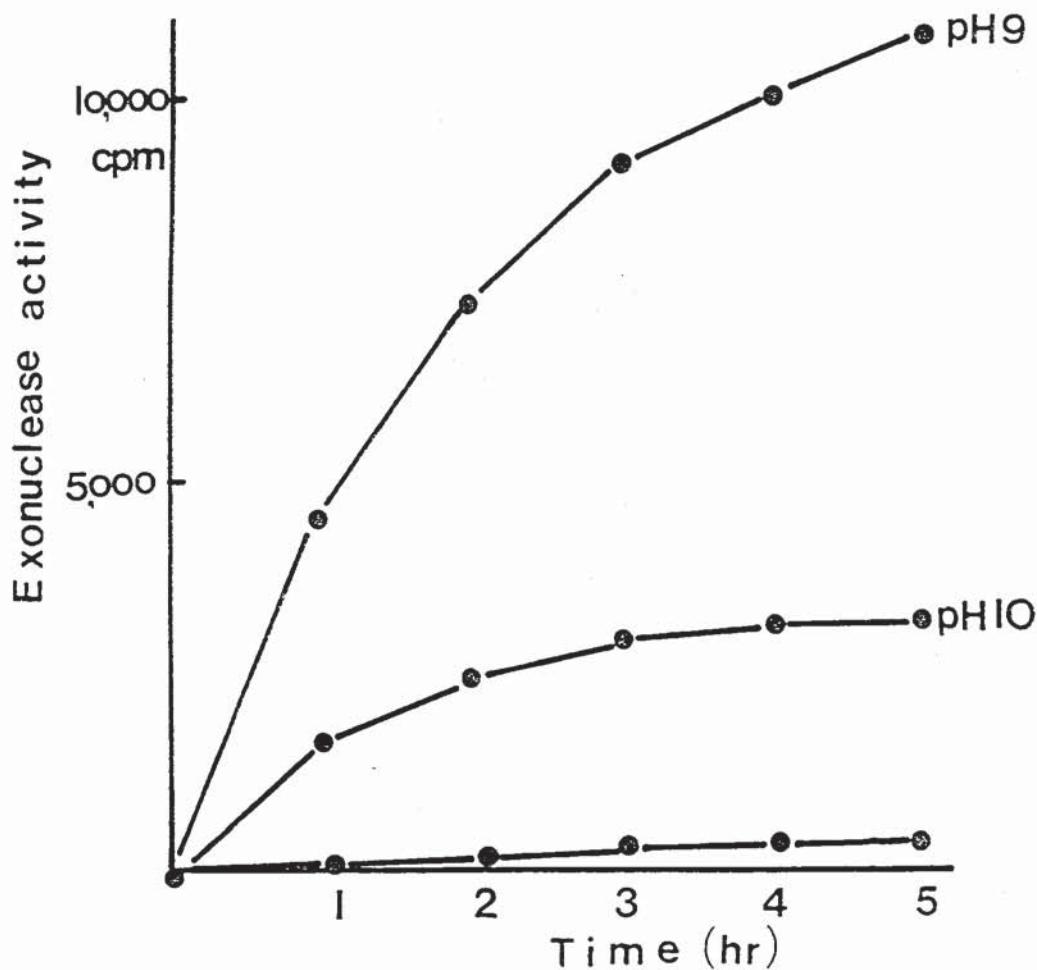
〔図 23〕

エキソヌークレアーゼの至適 pH

pH 3～11までのクリンシ緩衝液を用いて歯石端なpHでは緩衝作用は失われる。

エキソヌークレアーゼ活性を測定した。反応は37°Cで1時間行った。方法は本文

参照



[図24] エキソヌークレアーゼ活性。

[図23]よりエキソヌークレアーゼの至適pHが9であることがわかったので、活性の経時変化を調べた。方法は本文参照。活性のやや落ちるpH10についても測定した。

77

red22, red42 および 欠失変異株 $\Delta 8, \Delta 7, \Delta 6, \Delta 5, \Delta 4, \Delta 3$ などは pH 9 で エキソヌクレアーゼ活性はなかった。このことは先の相補性試験の結果を支持し、得られた欠失変異株はすべて redB 遺伝子の機能を果していなことがわかった。従って red 遺伝子産物は ダンパクバンド A, C, D とは対応せず、むろん バンド E, B に相当する可能性が高いと考えられる。そして バンド A が、 α 遺伝子に相当すると考えられる。分子量について、入のエキソヌクレアーゼが 25K, β ダンパクが 30K であるのに對し、バンド E が 25K, バンド B が 40K という大きさから、両者が対応しているのではないかと思われる。

(ii) P2干渉 入フージの場合 red 遺伝子の左側に α 遺伝子が知られている。大腸菌には P2 フージが溶原化している場合、入野生株はこの菌で増殖できない。これは P2 フージの old 遺伝子による。しかし入フージ変異株 red⁻, S⁻ 株は P2 の干渉を受けず溶原菌でも増殖できる。 ϕ 80 から得られた欠失変異株はすべて red⁻ であり、とくに $\Delta 8, \Delta 4, \Delta 3$ などはその欠失の長さが電顕により、全体の約 14% に達していることから red の左隣接して α 遺伝子に相当するものかあれば、それを欠失していると考えられる。従って ϕ 80 に入ると同様の P2 干渉現象があれば、これらの欠失変異株には P2 溶原菌でも増殖できるものがある可能性がある。P2 フージを入物菌 C600S に溶原化させ、これに ϕ 80 野生株、red⁻ 変異株、欠失変異株を感染させ、その増殖を調べた

[表9] エキソヌクレアーゼ活性

	Exonuclease activity (cpm/h)
φ80wild	2430
φ80red12(A)	3711
φ80red43(A)	2255
φ80red22(B)	86
φ80red42(B)	168
φ80Δ3	110
φ80Δ4	230
φ80Δ5	198
φ80Δ6	224
φ80Δ7	169
φ80Δ8	185
φ80ptrp190h	268

本文に記したように、フージ感染による溶菌液 0.1 ml 中のエキソヌクレアーゼ活性を測定した。ラベルレ³²P 大腸菌 DNA (594-³²P) 10 μ l, グリシン緩衝液 (pH 9.0) 0.2 ml, 大腸菌 tRNA 5 μ l, 1% 溶菌液 100 μ l を加え 37°, 1時間反応を行なった。過塩素酸で DNA を沈殿させ、上清に透析柱にて酵活性を測定した。フージ溶菌液は、L-プロスチド 1.5×10^8 /ml まで培養した C600S に m.o.i. 5 で各フージを吸着させ、10² 倍稀釈後、L-プロスチド 37°, 150 分間振盪培養したのにウロコヘルムを加えて調査した。どの溶菌液も約 10⁸/ml の活性があつた。

のが表-10 である。表に示したように ϕ 80 野生株は P2 溶原菌で増殖でき、 ϕ 80 には入の P2 干渉のような現象はないことがわかった。他の red⁻、欠失変異株についても当然、同じ結果であった。従って ϕ 80 に λ 遺伝子に相当するものがあるかどうかは疑わしい。

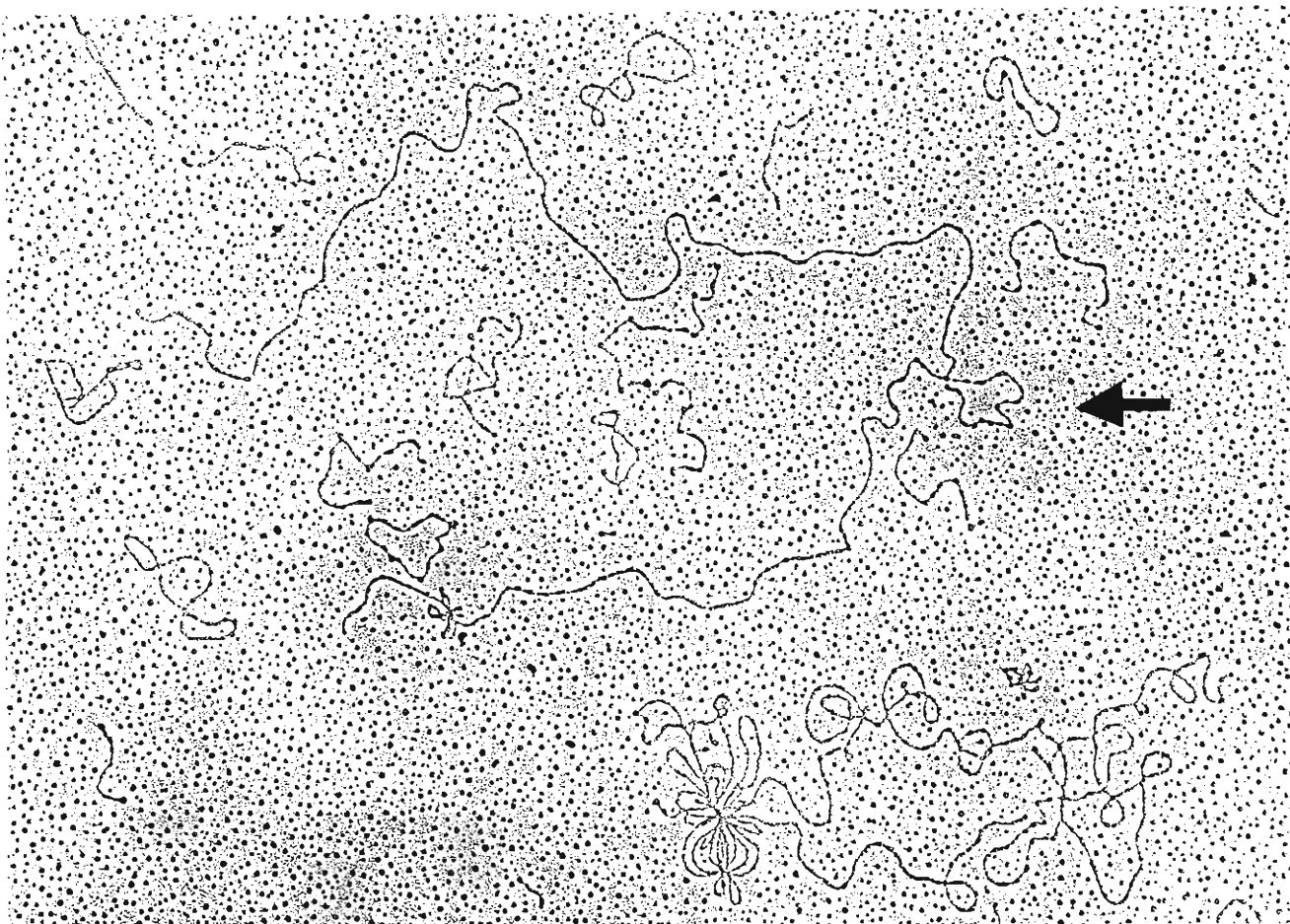
(二) ヘテロニ重鎖形成 得られた欠失変異株の欠失マッピングを ヘテロニ重鎖形成させて行った。欠失の最も長いと考えられる Δ 8 について行なった結果を 図25 に示した。方法はく材料と方法 1 に示した。 Δ 8 は ϕ 80 の全DNAの 14% を欠失していることがわかった。欠失の位置は 図25 のように 0.52 ~ 0.68 のところである。
red 遺伝子がある領域を含み、前の結果と一致する。 Δ 4 の欠失の位置は山岸らによて既に決定されており、 Δ 8 とほぼ同じ位置で同じ大きさの欠失であることがわかる。他の Δ 5、 Δ 6、 Δ 7 については実験中である。
24)

(ホ) フラーウ形態 得られた欠失変異株のフラーウは 594、CA5013、C6005、Y_{rel}、BT63 上で turbid である。溶原化することができる。(図 26)
以上 の 結果を 表 11 にまとめた。

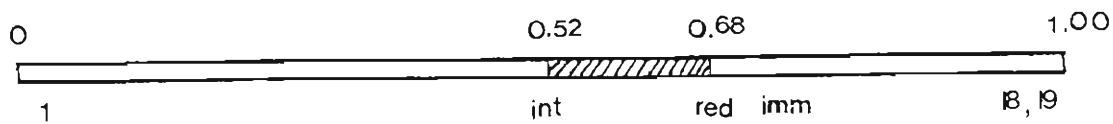
[表10] P2干渉現象

	P2 Interference	
	C600S	C600S(P2)
φ80wild	1.0	1.0
φ80ptrpl90h	1.0	1.3
φ80Δ3	1.0	0.8
φ80Δ4	1.0	1.0
φ80Δ5	1.0	0.9
φ80Δ6	1.0	0.8
φ80Δ7	1.0	0.7
φ80Δ8	1.0	0.7
φ80red12(A)	1.0	1.0
φ80red42(B)	1.0	0.7

P2アーティジとC600S菌に溶原化させ、さらに上記のφ80アーティジを感染させて、そのプレート交換率を、C600Sと比較した。C600Sで交換率を1.0とした。このC600SにP2が溶原化していることは、この菌がP2アーティジに対する immunity をもつこと、また、この菌がP2アーティジ產生することから確かめられた。プレートとしてT入アート、L-プレートを用いたが、その結果は同じであった。



$\times 25,000$



$\phi 80\Delta 8$

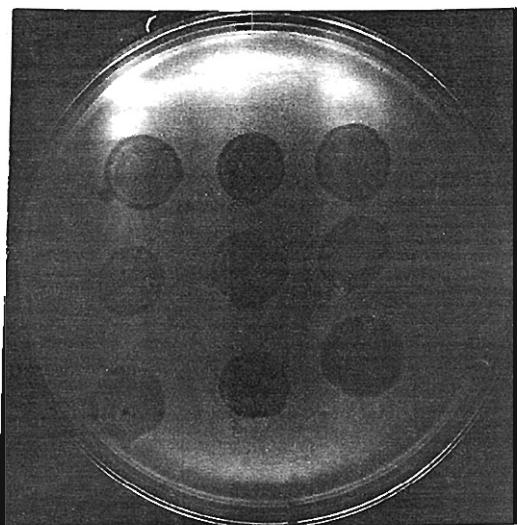
[図25]

最も欠失の大きいと思われる欠失変異株 $\phi 80\Delta 8$ の欠失マッピング

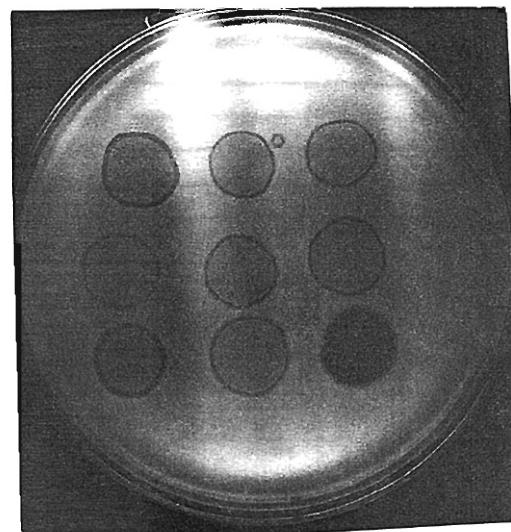
上図は $\phi 80$ 野生株と $\phi 80\Delta 8$ とのペテロ二重菌糸を電子顕微鏡で観察した所である (倍率 25,000 倍)。下図はそれらの距離を計算し求めた。失却の部分が欠失のためにできた一本鎖ループである

82

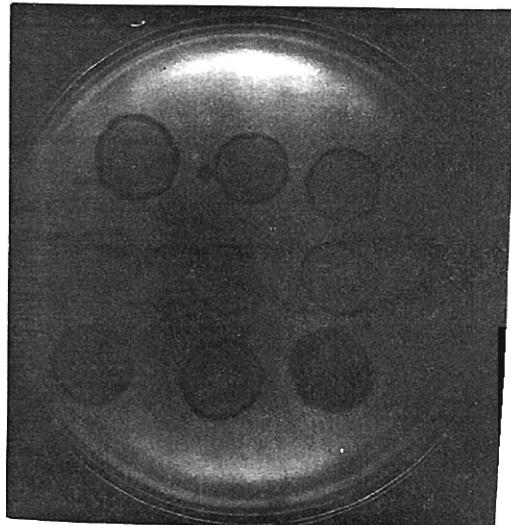
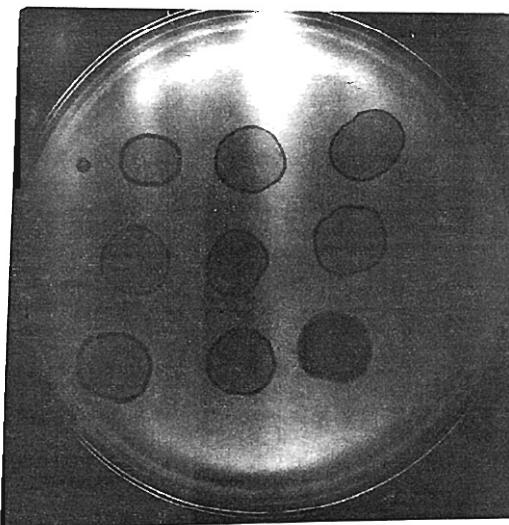
[図26]



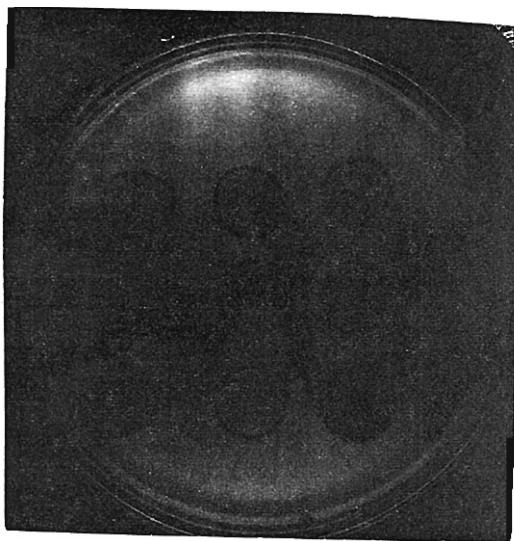
594



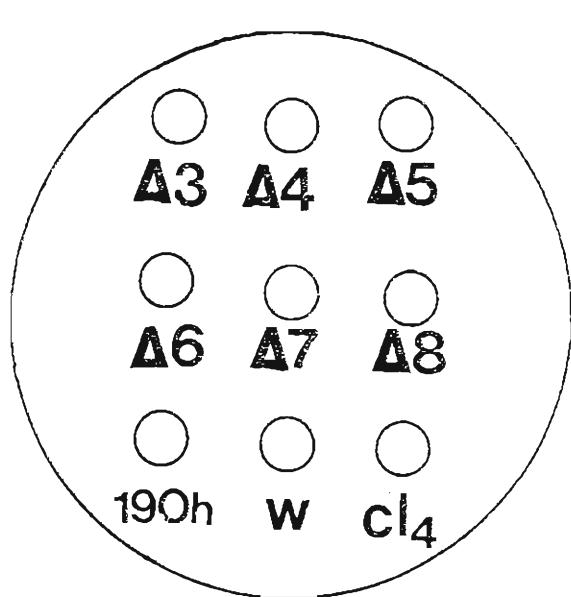
CA5013



C600S



BT63



[図26]の説明

欠失変異株の スポットの形態.

得られた 欠失変異株 ハーリアカタビット⁻, 59.4(Su⁻), CA5013(Su₁⁺)
C6005(Su₂⁺), YMEL(Su₃⁺), BT63(Su₆⁺)をまいて入平板上に
約 10^8 / ml のアニキススポットし、一夜37°C培養後観察した。

[表-11]

Characters of deletion mutants

	E	B	A	C	D	
$\phi 80$ wild		Δ5	Δ6	Δ7 190h	Δ3 Δ4 Δ8	
fec	+	+	±	±-	-	- - -
red	+	-	-	-	-	- - -
redA	+	-	-	-	-	- - -
redB(exo)	+	-	-	-	-	- - -
exonuclease	+	-	-	-	-	- - -
P2interference	-	-	-	-	-	- - -

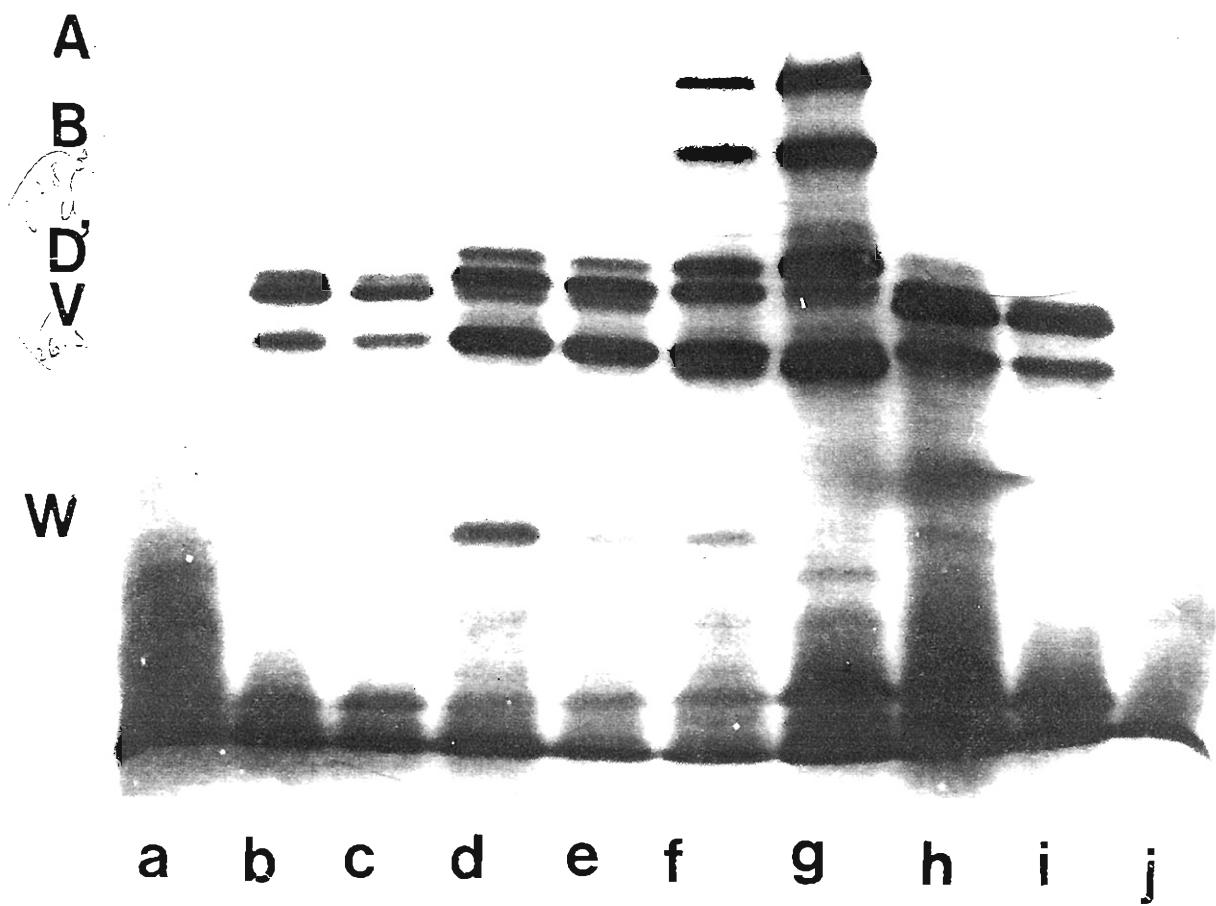
fec; growth on C600S recA , red ; growth on N6-11 polA'

redA; complement with $\phi 80$ redA12 , redB ; complement with $\phi 80$ redB42 , P2 interference; growth on C600S (P2)

4. 初期 mRNA の転写方向

前述したように UV 照射菌で検出できたタンパクは 第一群 (A, B, C, D, E) と 第二群 (U, V, W) に分かれ。これらが二つのオペロンから 転写・翻訳されていると考えられる。そして sus620 変異は この両方の遺伝子のバランスを逆転させると考えられる。これと同じことが $\phi 80\Delta 3 \times \phi 80sus620$ から得た組換え体、 $\phi 80\Delta 3 sus620$ についても見える。図 27 は $\phi 80\Delta 3$ と $\phi 80\Delta 3 sus620$ のそれぞれの UV 照射菌に於けるタンパクパターンを示したものである。 $\Delta 3$ の場合 検出できるバンドは U, V と ハンド D のフラグメントと思われるバンド D' (28K) が見られ、W のバンドは非常に薄い。しかし $\phi 80\Delta 3 sus620$ の組換え体では U 及び V のバンドが濃くなり、W のバンドが明瞭になるという変化が起こる。逆に D' フラグメントは減少していた。また新たに 31K のバンドが出現したが、その意味は不明である。このように $\Delta 3$ の場合にも sus620 変異があるすれば、第一群 (D') と 第二群 (UV, W) のタンパク合成のパターンが逆転することが確かめられた。これに対し $\phi 80\Delta 3 \times cIam7$ より得られた組換え体 $\phi 80\Delta 3 cIam7$ では、そのタンパクパターンは su-, sus+ とも $\Delta 3$ とそれと変わりなく、cI が二つら二群のタンパク合成パターンの変化に関与しているとは余り考えられない。

以上のような二群のタンパク合成パターンの消長は、二群のタンパクが二つのオペロンからの転写翻訳により合成されていることを示している。そのように二つのオペロンがあるとすれば。



[図 27] $\Delta 3sus620$ と $\Delta 3$ と $\Delta \Delta 3cIam7$ の λ -ゲノム ハーフ-ゲル

λ -V 製造菌 N3-1 (sus^-) . N3-1 $supF^-$ (sus^+) := $\Delta 3$ の宿主菌: $\phi 80\Delta 3sus620$,

$\phi 80\Delta 3cIam7$ を感染させ。そのゲノムを分離した。(a) N3-1 (sus^-) 宿主ウイルス

(b) $\Delta 3$ と N3-1 (sus^-) :=, (c) $\Delta 3$ と N3-1 $supF^-$ (sus^+) :=, (d) $\Delta 3sus620$

と N3-1 (sus^-) :=, (e) $\Delta 3sus620$ と N3-1 $supF^-$ (sus^+) :=, (f) $\phi 80$

$sus620$ と N3-1 (sus^-) :=, (g) $\phi 80$ 生株を N3-1 $supF^-$ (sus^+) := 感染

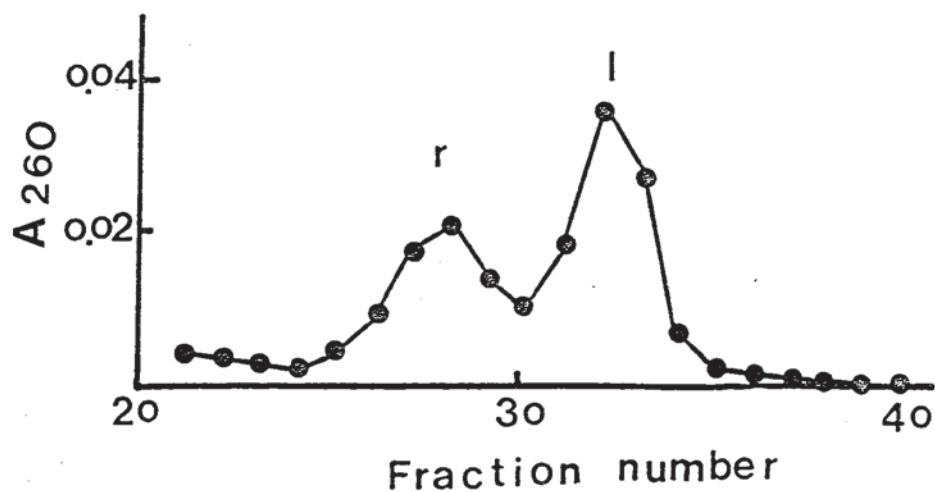
されたときのウイルスである。(j)は N3-1 $supF^-$ (sus^+) の宿主ウイルスである。

各ヌクレオソンの転写に関する遺伝子30の動きを調べる上で、二つのオペロンの転写方向を知ることとは非常に重要である。そこで二つのタンパク質の変化の顕著な二組、すなはち $\phi 80$ 野生株と $\phi 80$ sus620 变異株、および $\phi 80$ A3 と $\phi 80$ A3sus620 について感染初期の転写方向を調べた。感染初期 20 分までは OcS λ DNA とハイブリット形成する領域に転写がほとんど限られていることがわかるので、ハイブリット形成の典型 DNA としては OcS λ DNA に比べて $\phi 80$ DNA を用いた。さらに $\phi 80$ DNA を λ と r の一本鎖に分離し、

15)

それそれにハイブリットさせることによって転写の方向を調べた。 $\phi 80$ DNA は W. Szybalski らの方法に従って分けた。図 28 に示したようにホリヒゲは r 鎮により多く結合し、CsCl 离心分離してより重い方面に集まる。 λ 鎮と分離することがわかっている。得られた λ 、 r 鎮をよく材料と方法 1 に従って処理した後、シリカアフィルターに 5 μ g/ミルターにみるとように吸着させ、ハイブリット形成に用いた。

su^- の大腸菌 594 に、 \langle 材料と方法 1 に従って $\phi 80$ 野生株、sus620 变異株、 $\phi 80$ A3、 $\phi 80$ A3sus620 をそれぞれ感染させ、0 分、5 分、10 分、15 分、20 分の各時間に一分間 ^3H -ウリジンで mRNA をラベルした。RNA を抽出後、 $\phi 80$ DNA、 $\phi 80$ rDNA、 $\phi 80$ λ DNA のアフィルターとハイブリットを形成させ、フィルターに残った放射活性を測定した。結果を図 29 に示した。まず $\phi 80$ 野生株と $\phi 80$ sus620 を比較すると、前に述べたように $\phi 80$ 野生株では 15~20 分にかけて初期 mRNA 合成の低下が見られるのに対して、



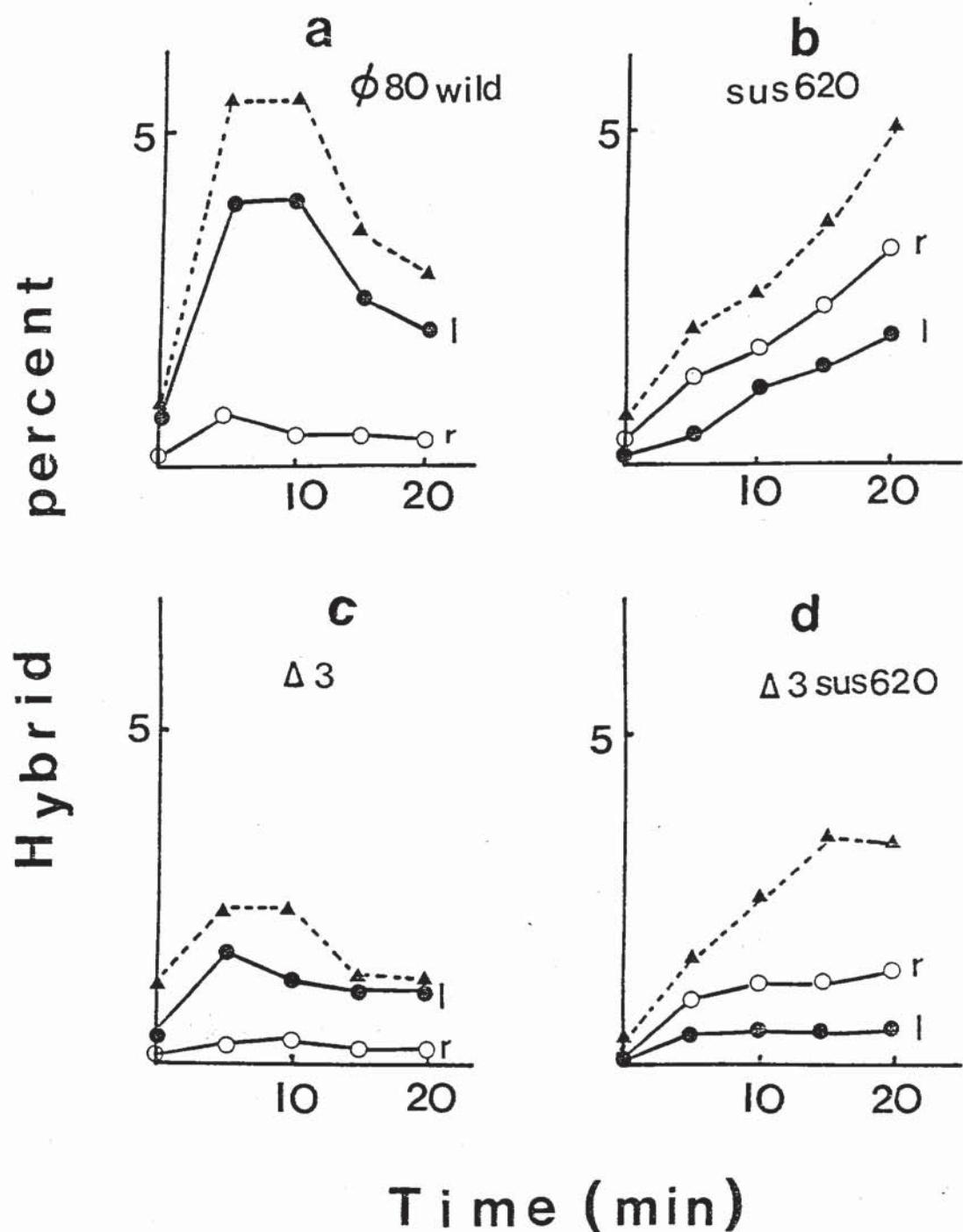
[図28] φ80 野生株 DNA の粗補鎖 分離

φ80 野生株 DNA を poly UG を用いて、 CsCl 密度勾配心で比重の重い方である。

1 分画は約 0.08 ml である。分画番号 28 附近のピーカーが r-鎖である。

φ80 DNA の r-鎖で、分画番号 32 附近のピーカーが I-鎖である。

[図29]



[図29]の説明 ϕ 80 初期 mRNA の転写方向

[図30]で ϕ 80 r, λ DNA 鎮を基型に用いて、初期 mRNA の転写方向を調べた。
詳しい方法はく材料と方法>で述べた。

ϕ 80 野生株, ϕ 80sus620, ϕ 80Δ3, ϕ 80Δ3sus620 を大腸菌

594 (su⁻) に感染させ、mRNA 合成速度の経時変化を調べた。

(a) ϕ 80 野生株, (b) ϕ 80sus620, (c) ϕ 80Δ3,

(d) ϕ 80Δ3sus620 をそれぞれ m.c.i. 5℃ 感染させ 20 分間まで

5 分おきに 1 分間パルスした。三角のマーカーは ϕ 80 DNA と、白円は

ϕ 80 r DNA 鎮と、黒円は ϕ 80 λ DNA 鎮とアブリット形成させたとき

の割合を示してある。

sus620は単調に令成速度が上昇していくことがわかる。次にΦ80野生株では、Φ80全株の電子のうちも鎖とハイブリット形成する左向きの電子が圧倒的であるのに対して、Φ80sus620では、γ鎖とハイブリット形成する右向きの電子が、鎖とハイブリット形成する左向きの電子を上回っていることがわかった。何様の結果はΦ80Δ3とΦ80Δ3sus620を比較した場合についても得られていた。この結果から、二つのタニパウ群をコトコトオペマンでは互いに逆方向に電子されていることが推論される。すなはち第一群のタニパウ(A,B,C,D,D',D'',E)はΦ80野生株で電子・翻訳が強く、鎖からの電子によつており、第二群(U,V,W)はsus620変異株でよく発現され、γ鎖からの電子によると考えられる。

まとめと考察

$\phi 80$ sus620 は、大腸菌 su^+ 、あるいは su^2 でサブレスされるアンバー突然変異株である。その変異の位置は $c\text{I}_4$ sus8 と sus620 との組換えの結果から $c\text{I}$ のすぐ左に（約 0.01 ~ 0.05 %）マップされることからかうだ。このように $c\text{I}_4$ の左にマップされる初期遺伝子のアンバー変異株は現在まで sus620 が唯一のものである。この sus620 に対する元の遺伝子を 遺伝子30 と命名する。

^{3}H -ウリジンによる RNA パルスラベル実験より、sus620 変異株では、 $\phi 80$ immunity領域近傍の初期 mRNA 合成のみが行なわれ、野生株で見られる中期、さらには後期の転写が見られなかった。さらに感染後 15 分から 20 分後の新生 mRNA 合成の低下もなかった。このうち前者の、 $c\text{I}$ の左に付く複製に関するといふと思われる宿主 mRNA の転写のないことがこの変異株を致死にしている原因であると考えられる。

また、sus620 変異は $c\text{I}$ の左にある必須でない遺伝子へ転写にも大きな変化を与えることが UV 照射菌を用いたタニパワーパターンの分析からわかった。UV 照射菌は ファージ由来のタニパワの検出に非常に有効な手段である。しかし $\phi 80$ 野生株を感染させた場合、検出できたタニパワは $c\text{I}$ から左の組換えに属する必須でない遺伝子産物である。sus620 をはじめ、他の興味ある sus 変異株や $c\text{I}$ 、 $c\text{II}$ の遺伝子産物は検出できなかった。これは UV 照射菌による artifact ではなく、元来 $\phi 80$ では

この左側のオペロンの転写、翻訳が強く、 β -ジタニ酸子の発現を調節しており、複製などに関与するタンパクの合成量がそれに比べて少ないと考えられる。このような minor タンパクの検出には、他の in vitro などの実験系を工夫する必要があるかもしれません。

このようにレバ細胞で検出できたタンパクを同定する目的で、 ϕ 80 野生株から EDTA 脱処理により、欠失変異株を単離したが、これらは図 21 に示すようにタンパクの欠失が順序立てあっており、ランダムな欠失を示さなかった。このことはそれらが一つのオペロンから転写・翻訳されていることを示唆している。そして、このようなく(バンド A, B, C, D, E) タンパクをコードする遺伝子の位置を決めることができた。B と E は同時に欠失するため、この実験からはその順序を決定できないが、山口のデータや入との対比から、おそらく E, B の順序であると思われる。欠失変異株はまた、すべて red A⁻, red B⁻ であり、B と E がそれらに対応すると考え、現在検討中である。また、欠失変異株△5 は fec⁻, △6, △7 は fec[±], △8 は fec⁻であることから、入の△に对应する遺伝子の産物はバンド A に相当すると考えられる。バンド A の右には、アンバーコードンで塗りつぶしてあるところが、バンド C とバンド D が存在する。 ϕ 80 野生株があくまでこのようないずれかの変異をもっていたことから、タンパクが初めてわかった。このバンド C とバンド D に相当するタンパクはとともに必須でなければならぬため、この変異が知られなかつたわけである。このような分子の役割については興味がある。これらの欠失変異株のとれる第一群のタンパクに見えし、元の変異の

とみなされた第二群のタシ10つかある。それらをコードする遺伝子の位置を確定してみると、バンドD
とCの間にある可能性が高い。Δ5, Δ6, Δ7などの欠失変異株では第一群に属するタンパクで次失していよいよバンドやフラクメントが現れることが既述したが、このことは次失と転写の
方向が向かい合っていることを示している。一方 fec⁻との対照やの80ptdp190hのタシ10のタシ1-
から、この第一群タシ10をコードするオペロンの転写が左方向で、そのプロモーターはオペロン
の右端にあり、欠失変異は DNA から C の方向へ伸びてると考えられるが妥当である。
そうすると、Δ8, Δ4, Δ3などの大きさの欠失変異でも H, W, Wなど第二群に属するタンパクが
現ることは、これらが少なくともバンドDより右側(Cの側)にあることを示している。そして
第二群のオペロンのプロモーターが、その左端にあり、転写は右向きに走るとすれば、先の
よりCの方向に伸びる欠失変異が Δ8, Δ4, Δ3などを越えて第二群のタシ10のオペロ
ンに及んだ場合、まず先にプロモーターが欠失し、そのため下流の遺伝子表現が停止
すると考えられる。そのためこの第二群オペロン上にもしも須遺伝子(遺伝子群と合わせて)が
あれば、そのような欠失変異株は生存できない。Δ4, Δ8などより大きい欠失を持つ変異株
がこれまで見つかったのは以上のようない理由によることは多いひとと考えている。この第二群タシ10
は sus620 変異によりその合成が増加する性質をもつて、同時に感染初期転写において
sus620 変異は右向きの転写を増加させることから、この第二群のタシ10が右向
きのオペロンによってコードされている可能性が高いため、また sus620 変異は第一群のタシ10

を減少させるとから、第一群の左向きのオペロンに主導権を与える。これらのことと結合して、sus620変異は第一群、第二群のオペロンに対して、次のような作用をすると考えられる。

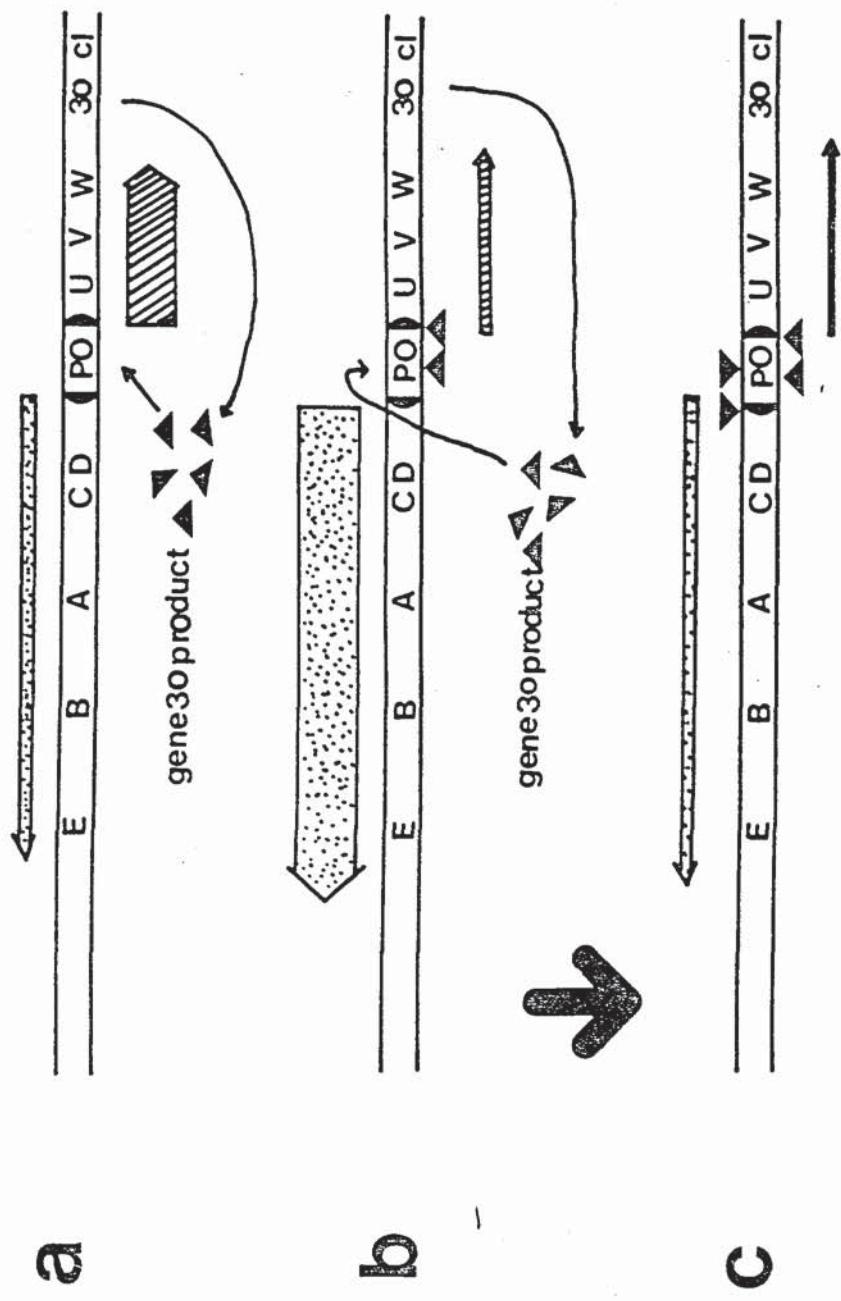
図30 のように第一群のタンパクは左向き、第二群は右向きのオペロンにコードされていると仮定すると、調節タンパクのない状態(図30a)では右向きアモーテーが強く働き、し、V、Wのタンパクが多く合成され、何らかの干渉作用によってこれと近接あるいは重複した左向きのアモーテーからの転写が阻害される。これがsus620変異のあるときの状態である。φ80野生株の場合には遺伝子30産物がこの方向の転写をレプロレーザーのような形で抑制するため、左向きの転写が回復し、第一群タンパクの合成が増加する(図30b)。感染後 時間がたつと、遺伝子30の産物が直接受あるいは間接的に左向きの転写を抑制するようになり、初期の両オペロンの発現比率(図30c)遺伝子30産物のない状態として、非感染菌のS100を用いたin vitro 転写系でφ80野生株DNAを轉写して転写を行なわせたが、それがin vivoを反映しているかどうかが問題がむずかしい。しかしながらDNAとハイブリットを形成する初期mRNAをL鎖とR鎖にハイブリットを形成させた結果、形成量は約1:1であり、上記の可能性に矛盾しなかった。しかし作用機序の証明には右向き転写とし、V、Wの第二群タンパクとの対応、第二群タンパクをコードする遺伝子の位置の確認。

漢字のより正確な様式などを知ることが必要である。

このような作用をもつ転写調節遠伝子は入フージにはなく、約80%に特異的なものであると考えられる。さらにこの遠伝子は中期遠伝子転写にも必須である。多くの役割を担っていることから、その作用機作に興味が持たれる。

[λ 30]

Transcriptional regulation by gene30 product



[図30]の説明、Φ80 遺伝子30の作用機構.

Φ80 初期転写と CII の左側について考察した。

(a) Φ80 初期転写は CII の左にあり隣接または重複したプロモーターから L, R 両方向にあります。L 鎌側には E, B, A, C, D などランジ替換によって与えられる遺伝子群があり、R 鎌側には U, V, W などのタンパクをコードしている遺伝子群がある。Φ80 sub620 が大腸菌に感染した non-permissive 状態では、この例のように L 鎌から出る転写が強く、R 鎌を転写するプロモーターの方が強力である。

(b) Φ80 野生株の大腸菌 感染後 0-15 分までの転写。permissive 状態で、感染直後には 遺伝子30 産物がこの R 鎌側の転写を抑制し、その結果、L 鎌の転写が増大する。この状態は感染後 15-20 分まで続く。

(c) Φ80 野生株の感染後 20 分以降の転写。感染後 20 分を過ぎると 遺伝子30 産物は L 鎌側の転写も抑制するようになり、初期 mRNA 転写が低レベルで抑えられる。

文 献

1. Hershey, A. D. *The bacteriophage lambda*, Hershey, A. D., ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratories (1971)
2. Sato, K., Nishimune, Y., Sato, M., Numich, R., Matsushiro, A., Inokuchi, H., and Ozeki, H. *Virology* 34, 637-649 (1968).
3. Hradecna, Z. and W. Szymbalski. *Virology* 38, 473 (1969)
4. Parkinson, J.S. and R.W. Davis. *J. Mol. Biol.* 56, 425 (1971)
5. Szpirer, J., and Brachet, P. *Molec. Gen. Genetics* 108, 78-92 (1970)
6. Furth, M.E., Yates, J.L., and Dove, W.F. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, XLIII, 147-153 (1979)
7. Grosschedl, R., and Hobom, G. *Nature* 277, 621-626 (1979)
8. Gelfand, D.H., and Hayashi, M. *J. Mol. Biol.* 44, 501-516 (1969).
9. Szymbalski, W., Kubinski, H., Hradecna, Z., and Summers, W.C. *Method in Enzymology*, 21-D, 383, Academic Press Inc., New York (1971)
10. Imamoto, F., *J. Mol. Biol.*, 43, 51 (1969)
11. Oppenheim, A.B., Katzir, N., and Oppenheim, A. *Virology* 79, 405-425 (1977)

12. Laemmli, U.K. Nature, 227, 680-685 (1970)
13. Davis, R.W., Simon, M., Davidson, N. Methods in enzymology, vol. 21 D, pp. 413-428. New York: Academic press. Inc. (1971)
14. Yamagishi, H., Inokuchi, H., Ozeki, H. J. Virology 18, 1016-1023 (1976)
15. Lozeron, H.A., and Szybalski, W. Virology 39, 373-388 (1969)
16. Ptashne, M. Proc. nat. Acad. Sci. 57, 306-313 (1967)
17. Matsushiro, A. BikenJ. 4, 133-135 (1961)
18. Sato, K. Virology 40, 1067-1069 (1970)
19. Yamagishi, H., and Ozeki, H. Virology 48, 316-322 (1972)
20. Yamagishi, H., Eguchi, G., Matsuo, H., and Ozeki, H. Virology 53, 277-282 (1973)
21. Deeb, S.S., Okamoto, K., and Hall, B.D. Virology 31, 289-295 (1967)
22. Miazzari, G.F., and Yanofsky, C. J. Bacteriol. 133, 1457-1466 (1978)
23. Radding, C.M. J. Mol. Biol. 18, 235-250 (1966)
24. Yamagishi, H., Inokuchi, H., and Ozeki, H. J. Mol. Biol. 106, 133-150 (1976)

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導を下さいました松代愛三教授、また適切なアドバイスや討論をして下さいました今本文男助教授はじめ、松代教研室員の皆様に、感謝いたします。

本研究に及ぶことのできない貴重な資料、フレジなどをして下さいました阪大医学部松原謙一博士、阪大理学部小川英行博士、京大理学部井口人郎博士、京大理学部山岸秀夫博士、京大ラ尔斯研 今井六雄博士、京文化研 岡穆宏博士、九大薬学部 塩内忠郎博士、阪大微研 山口剛博士に深く感謝いたします。