

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

バクテリオファージφ80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、入系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¹⁾に対してφ80についてそれらの研究はあまり進んでいない。

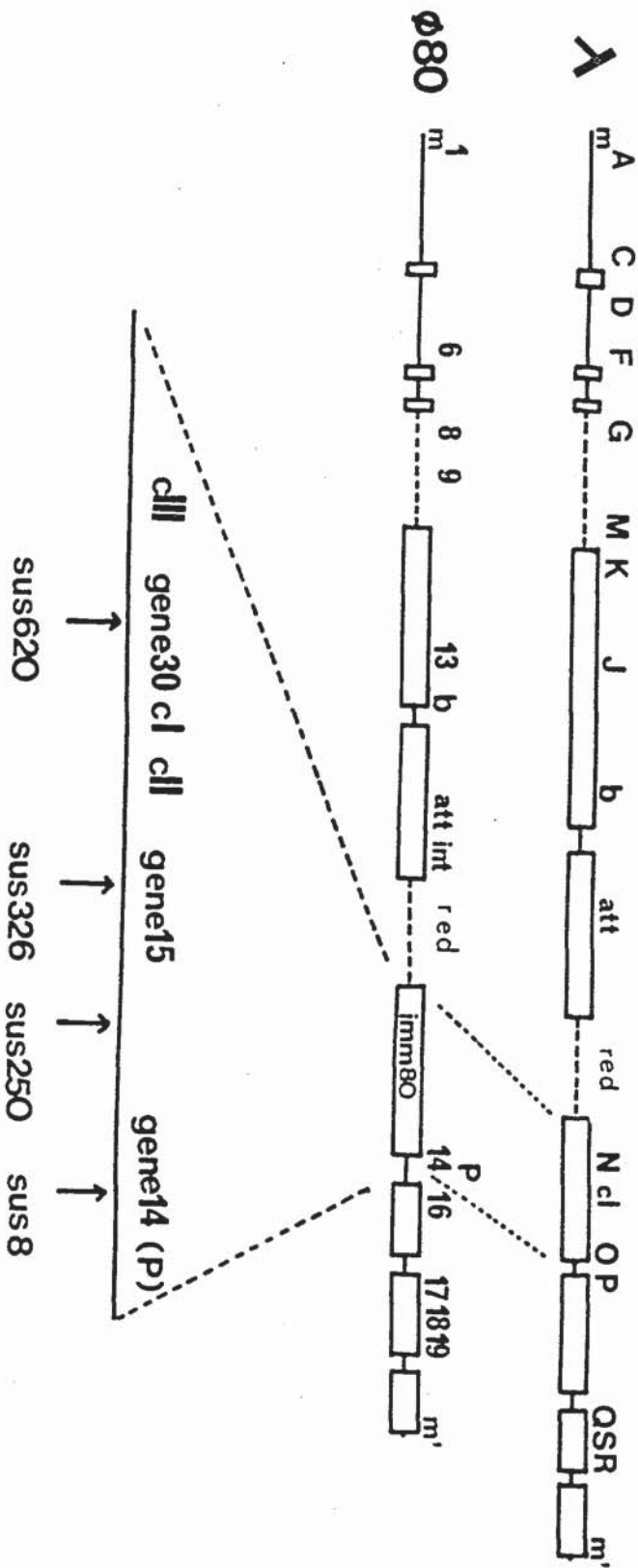
1960年 松代¹⁾により大腸菌からφ80ファージが単離された。その後佐藤らにより多くのsus突然変異株が²⁾とられ、その遺伝子のおよその配列が入ファージと類似している。immunity (免疫性)領域、頭部遺伝子尾部遺伝子領域から構成されていることがわかった。またφ80染色体DNAには入DNAと相同な部分が³⁾⁴⁾散在しているのが様々なハイブリッドファージが、E. Signer, N. C. Franklin, A. Oka により報告されており、⁵⁾ exonuclease、⁶⁾ P 遺伝子産物 (入ファージ) のように機能的に交換のできるタンパクのあることが知られている。最近では G. Hobomらがφ80と入の複製開始点付近のDNA塩基配列を決定し、両者に相同な構造のあることを⁷⁾示した。

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のみ進められ、その相同性に重点が置かれていた。しかしφ80DNAと

入DNAのハテロ二重鎖の電子顕微鏡による解析の結果は、図 1 に示した
ように多くの相同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質である
exonuclease や、複製に関与する遺伝子 P (φ80では遺伝子 14 に相当)
として塩基配列のわかった複製開始点付近は、すべて一部の相同部分
についての知見であることを考えると、その他の相同でない部分について
φ80とλの類似性を単純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、λ、φ80ともに興味ある問題であり、またこの領域
は相同でないことから、φ80に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φ80の感染初期の遺伝子発現の制御機構を
調べる目的で、これに重尋にかかわっていると考えられるsus620突然変異の
性質と、またタンパク質同定に必要であるため単離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 $\phi 80$



[図-1] 電子顕微鏡観察による $\phi 80$ 及び $\phi 80$ マージの増殖型遺伝子地図.

(Szybalski, Davis's)

矢線の部分は入と $\phi 80$ の相同部分、点線は比較的相同性のある部分、空白の部分は、相同性のない部分を示している。

材料と方法

1. バクテリアとファージ

実験に用いたバクテリアとファージは表-1, 表-2 に示した。

2. 培地, バッファー

T₁ plate は バクトリアトン (Difco) 10.0g, NaCl 2.5g, 寒天 12g を純水 1L に溶かしたものである。L-ブロス は 1L の純水 に バクトリアトン 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。T₁ バッファー の組成は 6mM の トリス塩酸緩衝液 (pH 7.3), 0.15mg/ml MgSO₄·7H₂O, 0.001% ジェラチン 0.25mM CaCl₂ である。

⁸⁾
HF 基本培地は 1L 中に, 3g NH₄Cl, 0.5g NaCl, 8g KCl, 10⁻¹M- トリス塩酸 (pH 7.4), 10⁻³M- MgSO₄, 10⁻³M CaCl₂, 0.1mg 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% ビルビン酸ナトリウム, 0.5ml の チミジン (10mg/ml), 200μg/ml の カザアミ酸を加えて 1L にしたものをを用いた。

[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

$\phi 80$	A.Matsushiro
$\phi 80$ gene30sus620	this work
$\phi 80$ h gene30sus620	R.Tomas
$\phi 80$ genel5sus326	K.Sato
$\phi 80$ sus250	K.Sato
$\phi 80$ genel4sus8	K.Sato
$\phi 80$ cI ₄	K.Matsubara
$\phi 80$ cI ₄ genel4sus8	this work
$\phi 80$ ptrp190h	our collection
$\phi 80\Delta 3$	M.Imai
$\phi 80\Delta 4$	H.Yamagishi
$\phi 80\Delta 5$	this work
$\phi 80\Delta 6$	this work
$\phi 80\Delta 7$	this work
$\phi 80\Delta 8$	this work
OcS ₇ ($\phi 80$ h ^{λ} att ^{λ} imm ⁸⁰ (QSsus7R) ^{λ})	A.Oka
Signer171 ($\phi 80$ imm ^{λ} (17,18,19) ⁸⁰)	E.Signer
SignerS ₇ ($\phi 80$ imm ^{λ} (Q,S,R) ^{λ})	E.Signer
$\phi 80$ cIam7	this work
$\phi 80$ cIam8	this work
$\phi 80$ cIam26	this work
$\phi 80$ cIIamA	this work
$\phi 80$ cIIamB	this work
$\phi 80\Delta 3$ cIam6	this work
$\phi 80\Delta 3$ gene30sus620	this work
$\phi 80$ red12	T.Yamaguchi
$\phi 80$ red22	T.Yamaguchi
$\phi 80$ red42	T.Yamaguchi
$\phi 80$ red43	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、T₁ プレートに $10^4 \sim 10^5$ の
ファージを大腸菌とともに 軟寒天 でまき、37°で約15時間培養した。
ほぼプレートが溶解したものに 5ml の T₁ バッファーを加え、4°で一夜
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°で 4-5 時間培養したものをを用いた。

in vivo の mRNA) のルス実験や UV 照射菌を用いた タンパクフラベル実験
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、 $32,000 \times g$, 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を用いた(約 10^{12} ファージ/ml)。

DNA フィルターを作ったためのファージは、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 ($\rho = 1.3, 1.5, 1.7$) で精製したものをを用いた。

さらに精製の必要な電子顕微鏡のヘテロ=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
を用いた。

4. DNA抽出とDNAフィルター調製

DNA-RNAハイブリッドに用いるDNAは、塩化セシウム段階的密度勾配沈降法によって精製したファージ ($5 \times 10^{12}/\text{ml}$) を 0.1 M リン酸, 0.1 M NaCl 緩衝液 ($\text{pH} 7.0$) で遠析した後、等容の左ロール (リン酸緩衝液で飽和したものを) を加え、30分間振盪して抽出した。水層をとり、 $1 \times \text{SSC}$ で遠析し左ロールを除いたものを、 100° , 10分間熱処理してDNAを変性させ、 $3 \times \text{SSC}$ で洗浄後、ミリポアフィルターに $40 \mu\text{g DNA}/\text{フィルター}$ になるように吸着させ、 $3 \times \text{SSC}$ で洗った後、乾燥し、8等分したものを ($5 \mu\text{g DNA}/\text{sector}$) をハイブリッド用フィルターとして用いた。

5. DNA相補鎖分離とDNAフィルター調製

DNA相補鎖分離は W. Szybalski⁹⁾ らの方法に従った。平衡密度勾配遠心法で精製した $\phi 80$ 野生株ファージ (DNA $100 \mu\text{g}$ に相当) に poly UG ($100 \mu\text{g}$), カルシウム塩ナトリウム, EDTA を加え、 $\text{pH} 8.0$ に調整した後、3分間沸とうさせ急冷した。CsCl を加えて $n_D^{25} = 1.4022$ に調整し、ベッマン 40 ローターで $30,000 \text{ r.p.m.} \times 60$ 時間 ($13 \sim 15^\circ$) 遠心後、分画し $\text{OD} = 60$ を測定した。図 28 で得られた 2 分画を集め、 0.3 N KGH で poly UG を除いた後、 $2 \times \text{SSC}$ で遠析した。最初は混入した相補鎖を除くため $66^\circ 4$ 時間 $T = -1$ した後、徐冷し

6×SSCで希釈しミリポアフィルターに 5μg/フィルターになおように吸着させ、
8等分して (0.63μg DNA/sector) 用いた。

6. mRNA調製と DNA-RNAハイブリット形成法。

mRNAのハルスラベルと DNA-RNAハイブリット形成法は ¹⁰⁷ 今本らの方法
に従った。大腸菌を L-ブロストで 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 (1mMKCNEを含む) に 3×10^9 /ml
になおように懸濁した。m.o.i 5でフェージを加え、30°, 10分間吸着させた後
低速遠心で集菌して遊離フェージを除き、 3×10^{10} /ml になおように 1×VB
培地 (Vogel & Bonner, 1956) に懸濁した。この懸濁液 0.2 ml を
20アミノ酸 (0.5mM) を含む 1×VB培地 3ml に加えて、30°で激しく振盪
して反応を開始した。ハルスラベルは指定の時刻に 150μCi の ³H-ウリ
ジン (20-25Ci/μmole) を加え、1分間 30°で激しく振盪して行なった。
ラベル後、T₁バッファーに 0.005 M MgCl₂, 0.01 M NaN₃, 150μg/ml のプロマ
イセチンを含む 0.01 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.3) を氷冷したものを (停止液)
に菌を入れて反応を止めた。低速遠心で集菌し、30μg DNase, 600μg
リヂンを含む停止液 2ml に菌を懸濁した後、凍結融解を3回繰り
返して細胞を破砕した。これに 0.1ml 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2), 0.2ml

SDS (5%)を加えて完全に可溶化した後、 0.005 M MgCl_2 を含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液(pH7.3)で飽和させた。左ノール 3.5 ml を加えて激しく90秒振盪して RNA を水層に抽出した。水層に2%酢酸カリウムと2倍容量のイソプロパノール(-20°)を加えて -20° で RNA を沈殿させた後、これを低速遠心で集めて、 0.5 M KCl を含む 0.01 M トリス・塩酸緩衝液 1 ml に溶解した。これをミクロアフィルター(CHAWP, $0.45\mu\text{m}$, 25 mm)で3回濾し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 0.5 M KCl を含む 0.01 M トリス・塩酸緩衝液 1 ml (pH7.3)に溶解してハイブリッド形成用 RNA 試料(約 $200\mu\text{g RNA/ml}$)とした。

ミニチューブ(φ約 0.5 cm , 長さ 3 cm)に DNA フィルターを入れ、調製した RNA 試料 0.1 ml (約 $200\mu\text{g RNA/ml}$)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 ($5\mu\text{g/ml}$, $1\times\text{SSC}$)で 37° , 30分間処理し、 $1\times\text{SSC}$ 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 フィ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照射菌の調製はおおむね M. Hayashi と A. Oppenheim の方法に従った。大腸菌を HF カザマシ酸培地で一晚培養したものを再び HF

カザアミ)酸培地に 1×10^7 /ml に合わせるように種を 37° で培養すると 3 時間時点で菌濃度は約 1×10^8 /ml にあつた。対数期にあつた。低速遠心で集菌し、HF 基本培地で 2 回洗った後、菌濃度を 3×10^8 /ml に調整する。紫外線を $1200 \text{ erg/mm}^2 \cdot \text{min}$ 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、フェージを指定した m.o.i. に合わせるように加え、 30° で 10 分間静置して吸着させた。この懸濁液 1 ml に 10 倍濃度の HF LA 培地 (1 l の HF 基本培地に、50 mM NaKPO₄ pH 7.2, 25% グラフト糖 80 ml, 4% エルビン酸ナトリウム 200 ml, チミジン (10 mg/ml) 5 ml, まよひ 19 種のアミ) 酸をそれぞれ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ を加えたもので、チロシン (チロシンを除く) を 0.1 ml, ¹⁴C-ロイシン (278 mCi/mmol), 又は ³⁵S-メチオニン (約 700 Ci/mmol) を 10 μC 加えて、 30° で 20 分間激しく振盪した。反応後氷冷した L-プロス 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、再び低速遠心で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

(2)

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、

0.2 M トリス塩酸 (pH 6.8), 8% SDS, 2 M β -メルカプトエタノール, 10% グリセロール
0.025% BPB をあつた. 濃縮用ゲルはアクリルアミド 8%, エスアクリルアミド 0.21% で
分離用ゲルは 15% アクリルアミド, 0.067% エスアクリルアミドであつた. 電気泳動
は試料重層後 20 分間, 70 V, 10 mA/ゲルで, その後 100 V, 12 mA/ゲルで
4 時間行つた. 泳動後 5 分以内にゲルを乾燥し, オトラジオグラフィを行つた.

9. ヘテロ二重鎖の電子顕微鏡による解析.

13)

ヘテロ二重鎖形成は Davis の方法に従つた. 精製した フェージ E 0.17 M EDTA
(pH 8.5) 中で二種混合し, NaOH でアルカリ処理して DNA を変性させた後, 70% ホル
ムアミド, NaCl, トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中で 26°, 1 時間遠析を行つたことによつ
てハイブリット形成を行つた. 50% ホルムアミド中でさらに 4°, 4 時間遠析した後, シト

14)

クロムを加え, 18% ホルムアミドの展開下層に広げた. パロジカル膜をはつたグリッド
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 により単離された φ80sus620 変異株は φ80 のプロファージマップで最も左側に位置する必須遺伝子のアパー突然変異体であることが知られている。φ80sus620 変異株は、su⁺ の大腸菌で増殖し、プラークを形成するが、その特異性は表-3 に示した。φ80_{sus620} 変異株は そのアパーコドンに Ser または Gln を置き換える su₁⁺ または su₂⁺ 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 に示したように 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り cI と sus620 変異の位置関係を決定した。

L-ブロスで培養した大腸菌 C600S を集菌し (1×10^9 /ml), φ80hsus620 と φ80cI4sus8 をそれぞれ m.o.i. 5 で重感染させた。37°、10分間吸着させ、感染を防ぐため L-ブロスで 100倍希釈後、37°で 150分振盪培養した。クロホルムで溶菌した後、大腸菌 C600S または 594 とともに Tλ プレートにまいて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。

$$\text{組換え頻度 (\%)} = \frac{(\text{組換え体})}{(\text{子ファージ総数})} \times \frac{100 \times 10^4 \times 10}{78 \times 10^6 \times 10} \times 2 \times 100 = 2.6 (\%)$$

[表-3] $\phi 80sus620$, $\phi 80hsus620$ のサブレッサー感受性

strains		$\phi 80wild$	$\phi 80gene30sus620$	$\phi 80h gene30620$
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}
	AE1	$< 10^{-6}$	$< 10^{-6}$	9×10^{-5}
su_1^+ (Ser)	CA5013	0.7	1.1	1.0
su_2^+ (Gln)	AE1 su_1^+	$< 10^{-6}$	$< 10^{-6}$	1.4
	C600S	1.0	1.0	1.0
	CA161	0.9	0.9	0.9
	AE1 su_2^+	$< 10^{-6}$	$< 10^{-6}$	1.1
su_3^+ (Tyr)	Yme1	0.8	7×10^{-5}	1×10^{-5}
	N3-1 $supF^-$	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, $\phi 80sus620$, $\phi 80hsus620$ とそれぞれ C600S(su_2^+) とともに T₁ プレートにまき. そのカバレッジを 1.0 とし, 他の菌上でのプレート効率を示した.

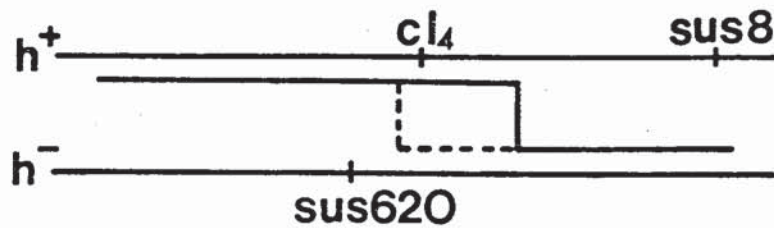
su^- 菌である 594 から得られた組換え体はほとんどがクリアであり、タービッド (turbid) との比は 7500 : 27 であった。次にこれらが遺伝標識である h (host range) について h^+ であるか h^- であるかを調べた (h^- フェージは大腸菌 AE1 (trp⁻, ton B) で増殖できるが、 h^+ フェージは増殖できない)。クリア プラークを 20 個調べたところ $h^- : h^+ = 2 : 18$ 、またタービッドプラークを 27 個調べたところすべて h^+ であった。このことから cI₄ と sus620 変異の位置関係は sus620 が cI₄ の左側にあることになり、その距離は sus620 変異と sus8 変異の距離を 2.6% とした場合、

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

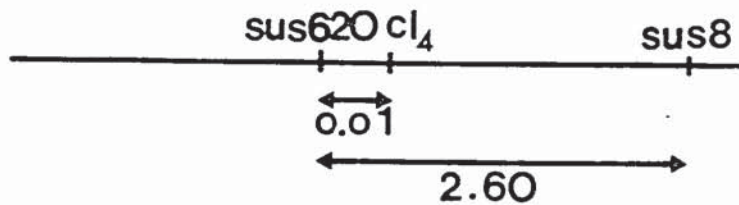
より、0.01% となった。

同様の結果が $\phi 80$ sus326 と $\phi 80$ h sus620 の組換え実験からも得られており、sus620 変異が 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 変異に対応する遺伝子はフェ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



[四 - 2] $\phi 80h.sus620 \times \phi 80cI_4.sus8$ の組換えによる $sus620$ 変異のマッピング。

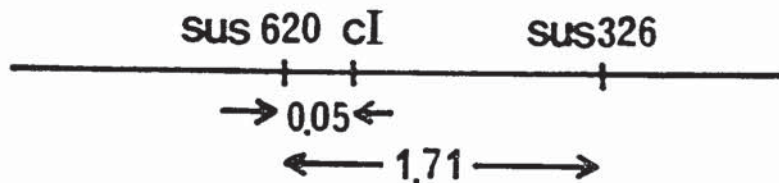
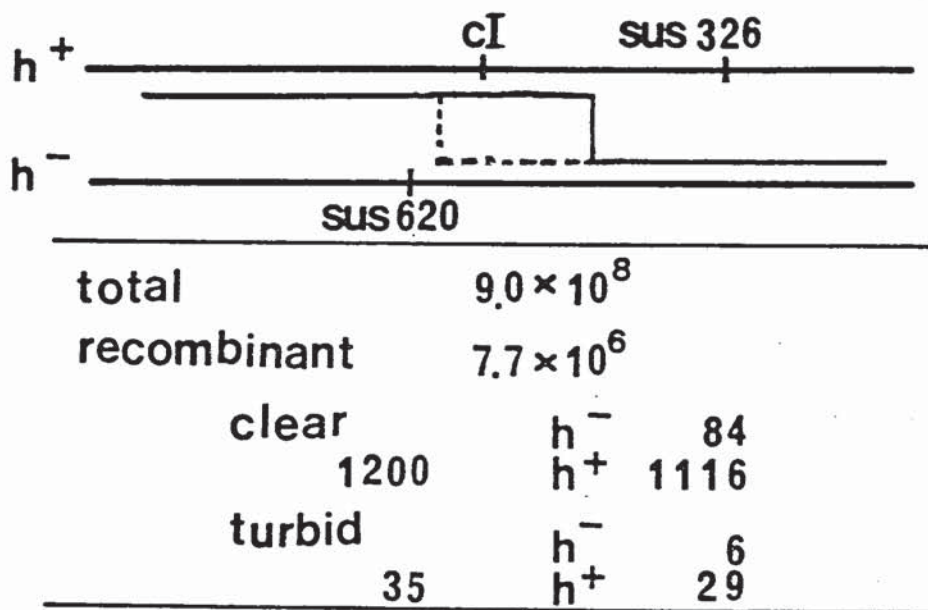
方法及び結果については「結果」で詳しく述べた。上の図で折れ線は

この組み換えによりできる su 感受性でないファージ遺伝子を示している。実線は cI_4

変異と持ちクリアアプラーフを形成し、点線は野生株と同じ遺伝子構成で濁点

アプラーフを形成するはずである。非淘汰遺伝座識は cI よりかなり左にある。

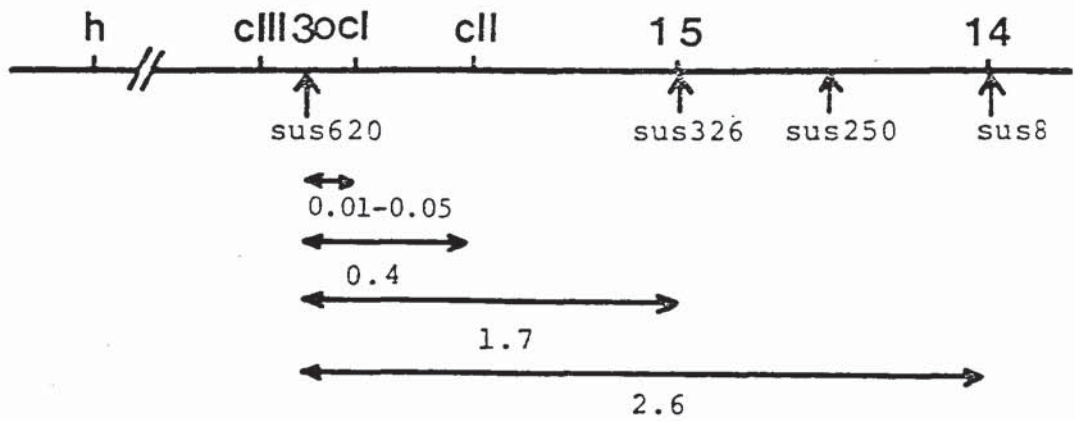
クリアアプラーフについては、その内の 20 個についてマーカー (h) を調べた。



[図 3] $\phi 80 h^+ sus 620 \times \phi 80 h^- cI_4 sus 326$ 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 $\phi 80$ Early Regulatory Region



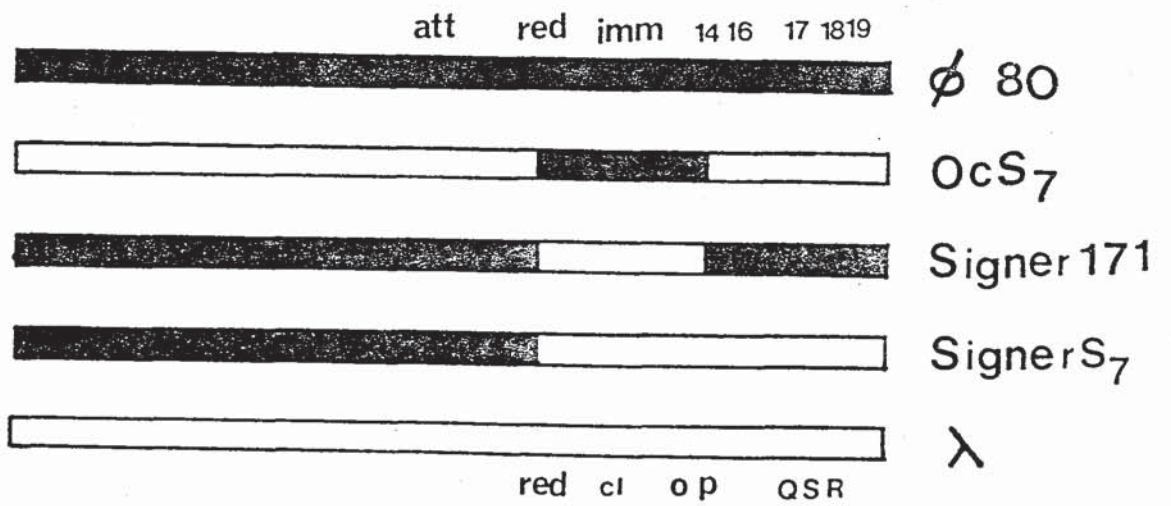
[図 4 $\phi 80$ sus620 変異の位置

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 の正側近傍に sus620 変異がマップされることが確認された。

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合成をなすかについては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λと似ていて、感染後30分まではφ80DNAの鎖の合成が主に行われ、その後鎖の合成に移ることが知られている。しかしその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^- の大腸菌 (HfrH) 及びこれと遺伝子構成が同じ su_2^+ の大腸菌 (HfrH C161) 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 3H -ウリジンで RNA を 1 分間パルスラベルした。フェノールで RNA を抽出した後、φ80, λ およびそれらのハイブリッドファージ DNA を鋳型としてフィルター法でハイブリッドを形成させた。用いたハイブリッドファージ 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, それと逆に red より遺伝子 0, 遺伝子 P 付近までが λ DNA で他の部分が φ80 DNA から構成された Signer 171 DNA, また red より遺伝子 Q, S, R までが入りである Signer S_7 DNA の 3 種類を用いた。このようなファージ DNA をハイブリッド形成の鋳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 鑄型 DNA.

黒い部分は ϕ 80の、白い部分は λ のDNAを示してある。

immunity 領域の転写), (ii) 中期 mRNA (Signer 171 DNA とハイブリットを形成するが, Signer S₇ DNA とはハイブリットを形成しない, 遺伝子 14, 15, 16 付近の転写) (iii) 後期 mRNA (Signer S₇ DNA とハイブリットを形成する, 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 φ80 野生株を 大腸菌 CA161 に感染させた場合、合成されるフェージ 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第一に、感染後 15 分までに合成されるフェージ mRNA のほとんどは OcS₇ DNA とハイブリットを形成することがわかった。すなわち red 上の 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。λ について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。すなわち λcI の右にある tof 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。φ80 においてもおそらくこれと似た機構が存在し、初期 mRNA 合成の低下が起こるのではないかと考えられる。第二に 野生株では フェージ感染後 25 分からフェージ mRNA 合成速度が急に上昇した。この mRNA は OcS₇ DNA とハイブリットを形成する割合が少なく、むしろ Signer 171 フェージ DNA とハイブリットを形成した。しかし一方、Signer S₇ DNA とのハイブリット形成率が Signer 171 a

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分を過ぎるとフェージ RNA 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 などが発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, Signer S₇ とハイブリットを形成し、時間がたつにつれ両者の差が少なくなる
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 タンパク質とコード
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 φ80 野生
株の転写様式は、Szybalski らの結果と、r 鎖の転写を中期、後期の
mRNA (Signer DNA とハイブリット形成する) に、l 鎖の転写を初期 mRNA (Oc
S₇ DNA とハイブリット形成する) に対応させることにより一致することがわかった。

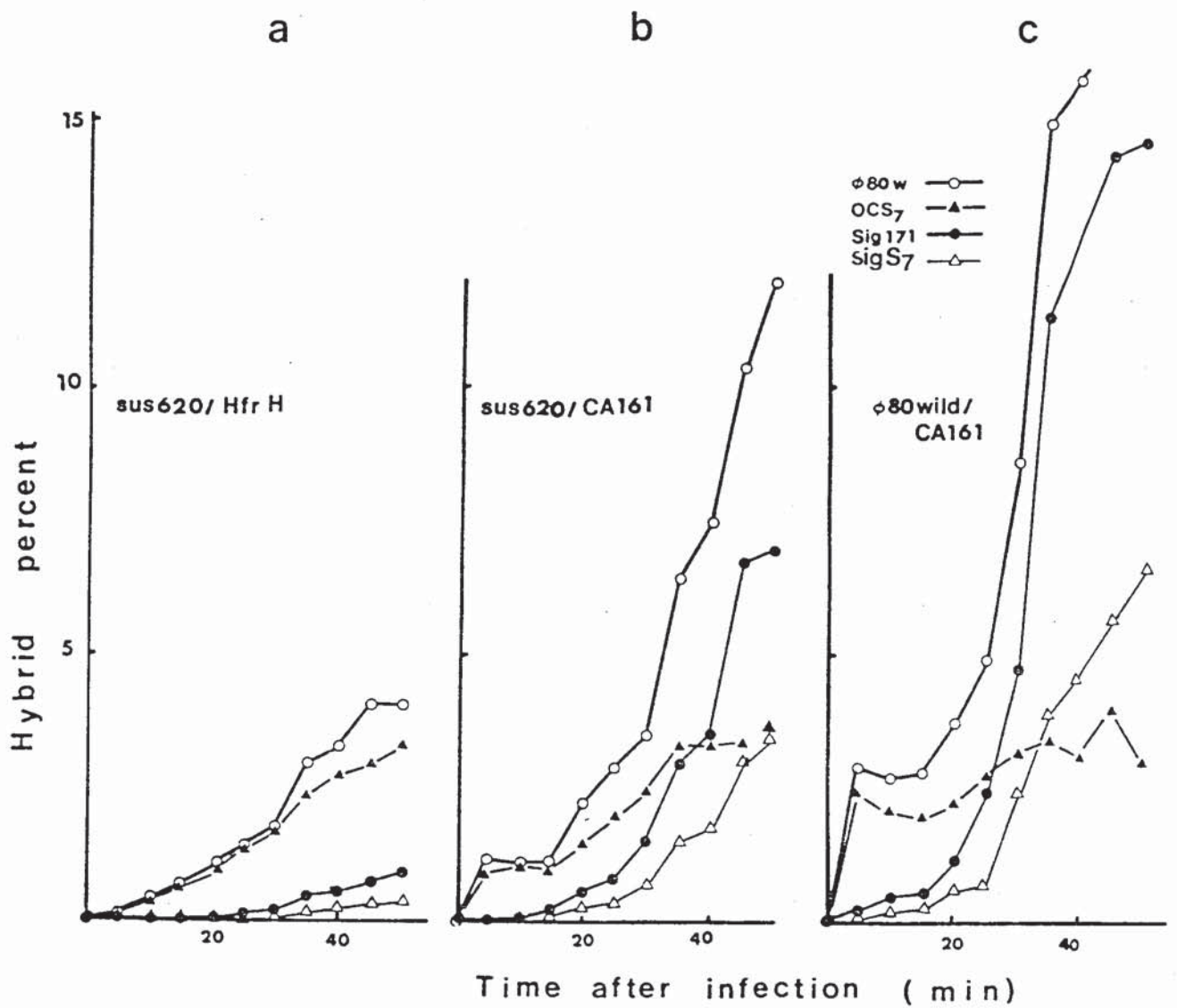
次に φ80 sus620 変異株を SU⁻ 菌 (HfrH) に感染させた場合の転
写様式を調べた。図 6-a のようにフェージの増殖できない (non-permissive)
SU⁻ 菌中でも sus 620 変異株は mRNA を合成しており、感染後時間の経過
とともにその合成速度が単調に増加した。感染後 50分までインフルエンザ
された全 RNA 中、フェージ mRNA 合成速度は 5% に達した。この RNA は
また、そのほとんどが Oc S₇ DNA とハイブリットを形成し (75% 以上)、その速

に Signer 171, Signer S₇ DNA とはハイブリットを形成しなかった。このことから、non-permissive な条件下では、φ80 sus620 変異株は immunity 領域を含む初期 mRNA の合成のみが起きている。遺伝子 14, 15, 16 付近の中期 mRNA による後期 mRNA の合成がほとんど認められないことがわかった。

次に φ80 sus620 変異株を su₂⁺ である大腸菌 Hfr HCA16112 に感染させた場合の転写様式を 図 6-b に示した。この permissive な条件下での転写様式は non-permissive な場合と異なり、φ80 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。すなわち感染後 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 分以上の後期 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、su₂⁺ によるサプレッスが加わっていることが原因として考えられる。

このように sus620 変異株の non-permissive な条件下での転写様式は野生株、又は permissive な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。という特徴をもちことがわかった。このことは sus620 に対応する遺伝子 30 が中期・後期 (r 鎖) の転写に必須であると同時に、

直接または間接的に初期 mRNA 合成の抑制 (turn off に似た現象、
鎖) に関与している転写調節遺伝子であることを示している。



[図 6] $\phi 80$ 野生株と $\phi 80 sus620$ 変異株の転写様式

大腸菌 HfrH(su^-)と CA161(su_2^+)に $\phi 80$ 野生株と $\phi 80 sus620$ 変異株を感染させ(m.o.i. 5). 指定した時刻に³H-ウリジンで1分間パルスラベルし、RNAを分析した。(a) HfrH(su^-)に $\phi 80 sus620$ を感染させた(non-permissive), (b) CA161(su_2^+)に $\phi 80 sus620$ を感染させた, (permissive), (c) CA161(su_2^+)に $\phi 80$ 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

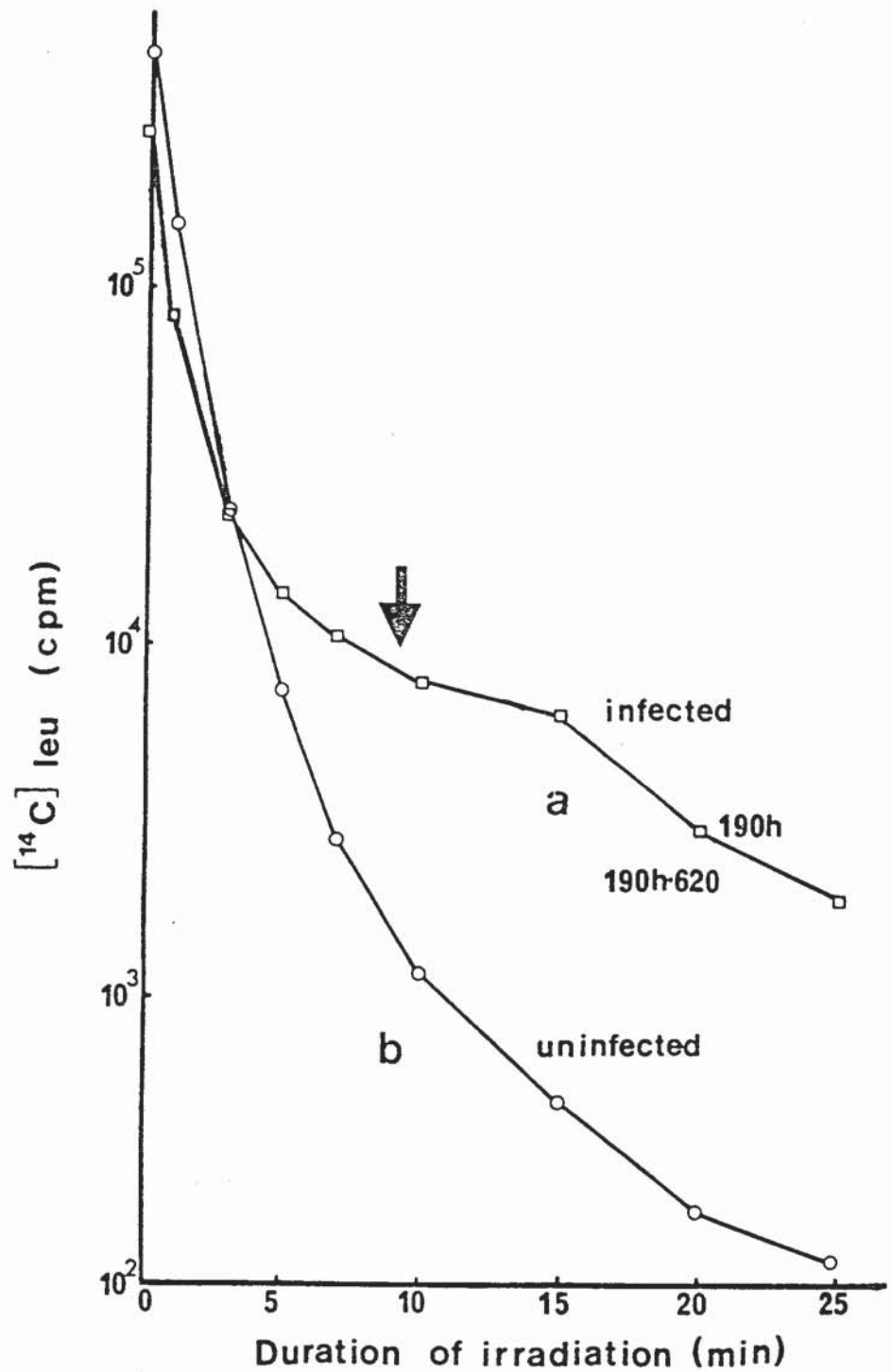
前述のように $\phi 80$ 変異株が *SU* 菌に感染した場合、初期 mRNA 合成は見られるが、中期・後期 mRNA 合成が行われていなかった。このことは当然、感染したファージの合成するタンパクの分子種にも投与されると考えられるので、次にこれらのタンパク分子種のパターンを比較した。ファージを感染させた大腸菌には大腸菌由来のタンパクが多く、ファージ DNA によってコードされるタンパクだけを同定することはむずかしい。T 系ファージなどの場合には感染したファージが宿主大腸菌のタンパク合成を停止 (shut off) するので新たに合成されるタンパクを放射性同位元素でラベルすれば、ファージタンパクのみを検出できる。しかし $\phi 80$ の場合、感染後、宿主大腸菌に対する shut off は弱いので UV 照射大腸菌を用いて

16)

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 は損傷により転写・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 $\phi 80$ に適用するため大腸菌への UV 照射量、UV 照射菌への $\phi 80$ 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、 $\phi 80 \text{ p} \text{ trp} 190 \text{ h}$ を $\text{m.o.i. } 100$ で感染させた場合と、 F^- 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 分間処理した後、ミリポアフィルターで過し、フィルターに残った放射活性を測定した。図 7 a 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 F^- 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った。しかし $\phi 80 \text{ p} \text{ trp} 190 \text{ h}$ を感染させた場合 (a)、UV 照射量が $5000 \text{ erg} / \text{mm}^2$ (約 4 分) 以上になると F^- を感染させない場合 (b) と差がでてきた。この差が F^- タンパクに取り込まれた放射活性化合物の量を示している。 F^- 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) しかまできるとは少ない UV 照射量として $10,800 \text{ erg} / \text{mm}^2$ ($1200 \text{ erg} / \text{mm}^2, \text{min} \times 9 \text{ min}$) を選び、以後 常にことわらない限り、この線量を実験に用いた。

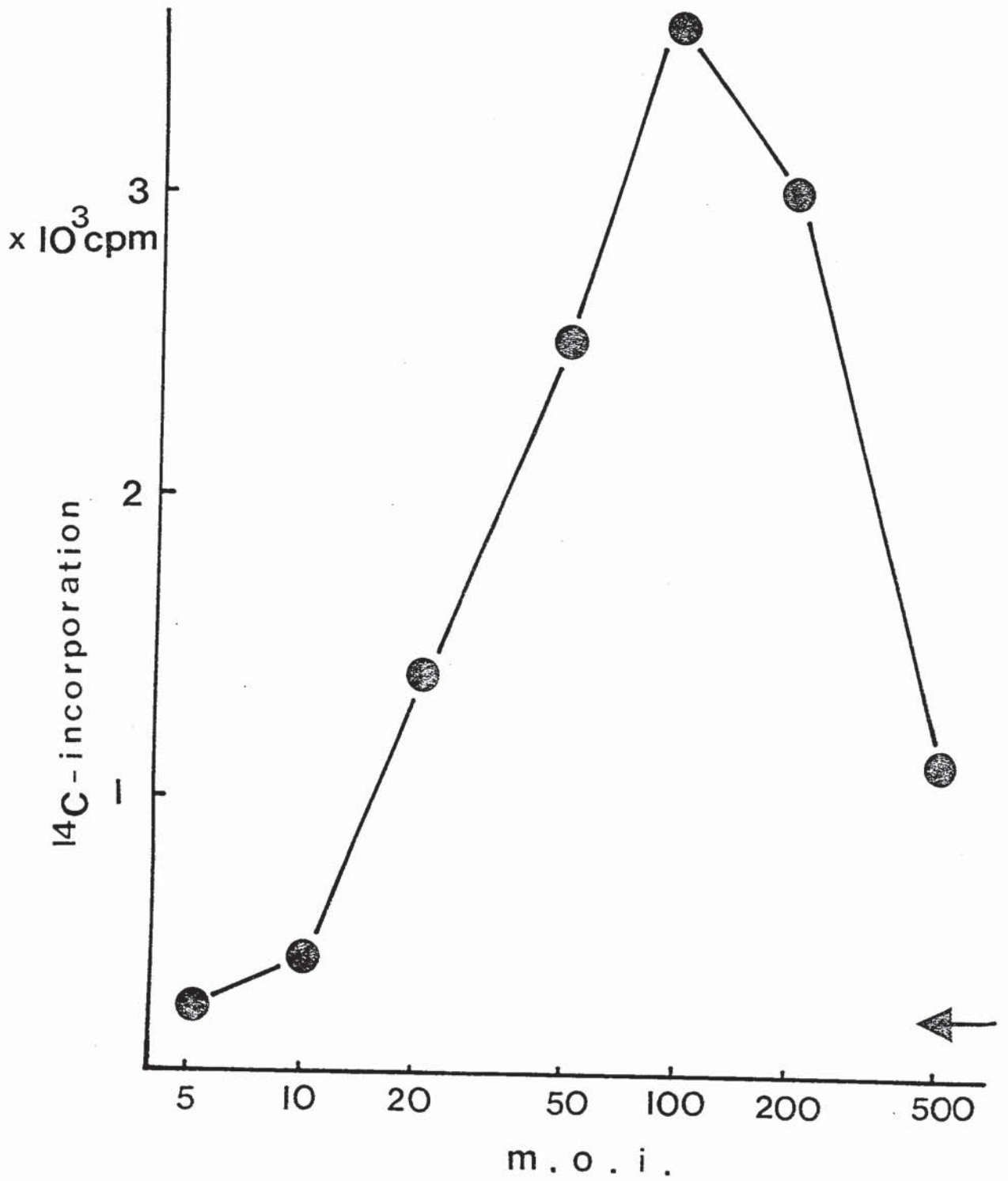
次に感染させる F^- の m.o.i. を検討した。UV を照射した大腸菌 159 に $\phi 80 \text{ p} \text{ trp} 190 \text{ h}$ を種々の m.o.i. で吸着させ、その後 ^{14}C -ロイシンの取り込みを調べたのが 図 8 である。感染させた F^- の m.o.i. の高い方が、取り込みが多かったが m.o.i. 200 ~ 500 になると取り込みは逆に減少した。したがって以下の実験では m.o.i. 50 で感染を行なった。この m.o.i. 50 という値は、



[図7] フェージの ¹⁴C-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, φ80ptp190hを mci. 100で感染させた場合.

の ¹⁴C-ロイシンの取り込み. (b). フェ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 -ロイシンの取り込みを与える ファージ m.o.i.

の影響. UV を $10,800 \text{ erg/mm}^2$ 照射した大腸菌に $\phi 80\text{ptrp190}$ の

を指定した m.o.i. で感染させ、 ^{14}C ロイ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レベルである. 方法については

は本文を参照.

一般に用いられている m.o.i. 5~30 (A. Oppenheim¹¹⁾, M. Ptashne¹⁶⁾) という値と比較すると高いが、これは $\phi 80$ の吸着には効率のよくない HF 基本培地と、非常に塩濃度の高い (KCl 0.1 M) 培地中を行なったため、実際の effective な m.o.i. は入での実験に用いたものと同じ程度に高くと考えられる。

(B) $\phi 80$ 野生株と $\phi 80$ sus 620 変異株のタンパクハーターンの比較

<材料と方法>に従い上記の条件で UV 照射文腸菌に $\phi 80$ 野生株を感染させ、 ^{14}C -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り分析した。しかし ^{14}C -ロイシンでは放射比活性が低く、短時間ではオートラジオグラフがよくないため、その後の電気泳動パターンはすべて ^{35}S -メチオン (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なかった。図 9 が $\phi 80$ 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 バンドがフェージ由来のタンパクである。また低分子領域 (約分子量 10000 以下) に宿主にも弱いバンドが見られるが、これは UV 照射した宿主文腸菌由来の不完全なポリペプチドである。

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)

— A 45K

— B 40K

— D 31K

U 29K

— V 26K

E 25K



host $\phi 80$

[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-マゼマTMの培養地

で培養後、UVを 10,800erg/mm² 照射した。 $\phi 80$ 野生株を m.o.i 5 で

感染させたものと、させないものを用意し、10 μ G/ml に可溶化TMに SDS-アセチン

を加えて 20 分間、30° でラベルした。菌を SDS-アセチン緩衝液で溶菌、可溶化

し 15% アクリルアミド電気泳動にてタンパクを分析した。

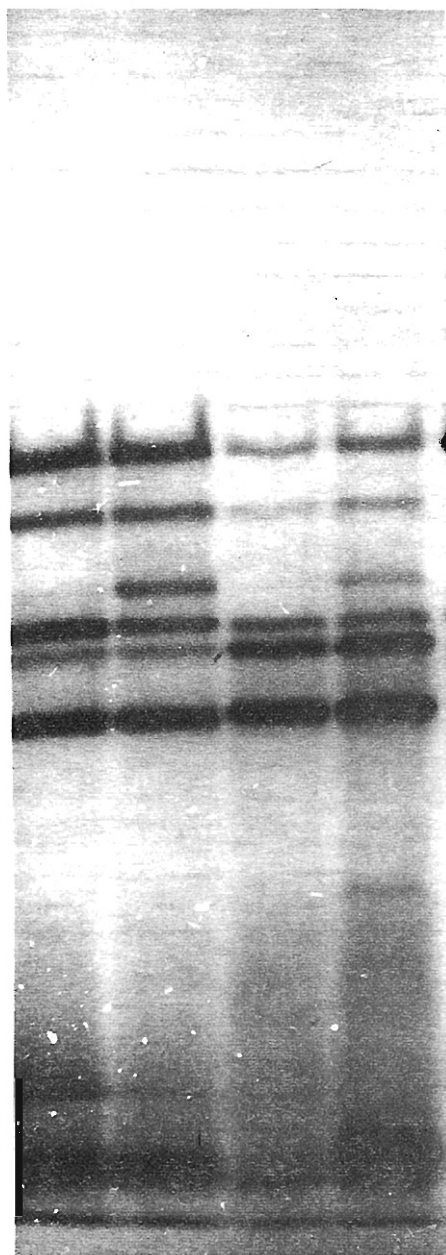
major バンド ; バンド A (45 K), バンド B (40 K), バンド D (31 K)

バンド E (25 K).

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

次に $\phi 80$ 野生株と $\phi 80$ sus 620 変異株の タンパク質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、また この遺伝子産物の野生株のタンパク質パターンで識別できるなら、 su^- 菌に $\phi 80$ sus 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るはずである。先に用いた大腸菌 159 は su^- であり、これと isogenic で $\phi 80$ の感染する su^+ 菌は単離されていないので、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^+, su_3^+) 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 $\phi 80$ 野生株を N3-1 (su^-), N3-1 supF⁻ (su_3^+) に、(c),(d) は $\phi 80$ sus 620 変異株を N3-1 (su^-), N3-1 supF⁻ (su_3^+) 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った。

第一に、 $\phi 80$ 野生株を N3-1 (su^-) に感染させてできたタンパク質は、前述の 159 (su^-) の場合と同じパターンを示したが、N3-1 supF⁻ (su_3^+) に



A, 45K
 B, 40K
 C, 34K
 D, 31K
 U, 29K
 E, 25K
 (V, 26K)

a b c d

[図10] $\phi 80$ 野生株と $\phi 80_{sus620}$ 変異株の初期フュージョンの比較

UV照射した $uvrB^-$ 菌 N3-1 及び N3-1 $supF^- (su3^+)$ に $\phi 80$

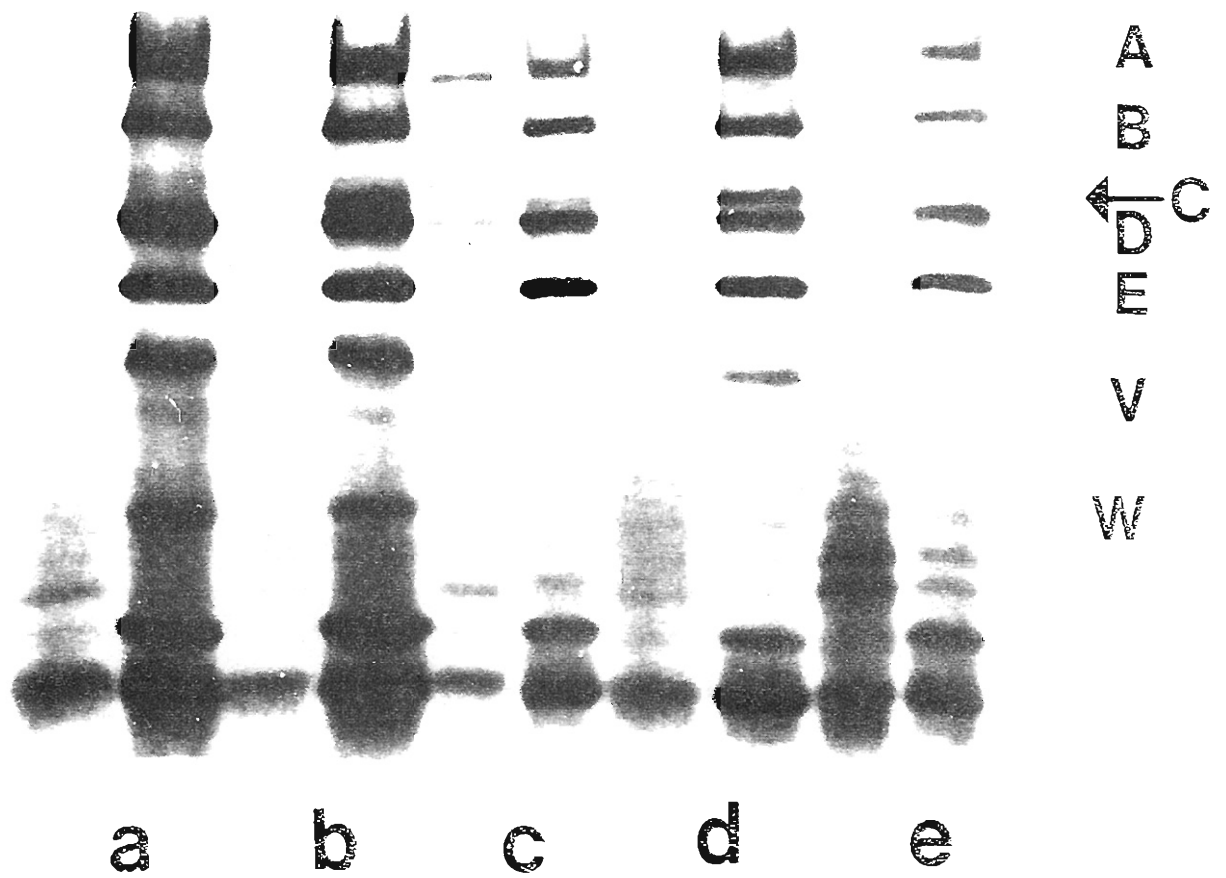
野生株と $\phi 80_{sus620}$ 変異株を感染させ、 ^{35}S -メチオニンでラベル後、

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分子量を分析した。

(a) $\phi 80$ 野生株を N3-1 (su^-) に感染させた。(b) $\phi 80$ 野生株を N3-1 $supF^- (su3^+)$ に、

(c) $\phi 80_{sus620}$ 変異株を N3-1 (su^-) に、(d) $\phi 80_{sus620}$ 変異株を N3-1 $supF^- (su3^+)$

感染させた場合は新たに34K タンパクが出現した。この34K
のバンドは sus620 変異株を su_3^+ 菌に感染させた場合にも検出できた。こ
のタンパクは UV 照射した フェージ非感染菌 N3-1 $supF^- (su_3^+)$ 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 $\phi 80$ 野生株を感染させた場合にも検出できたことから、 $\phi 80$ 野生株の遺伝
子にあってアンバーコドンが サプレッサー tRNA により サプレスされて合成されたタンパクで
あることが確かめられた。このことは 1960 年松代において単離され、現在
実験に用いられている $\phi 80$ 野生株が、元来、その構造遺伝子中に、アンバーコドンをもった
ものであることを示している。しかし $\phi 80$ 野生株は プラーク形成効率やプラーク形
態で見ると限り、 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 フェージ増殖に関係なく、 su^+ 菌では 34K の新たな
タンパクが非必須遺伝子産物として産生されると考えられる。この 34K のタンパク
をバンド C (34K) 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 (34K) タンパクの出現に伴ない、それより分子量の小さい 31K
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。 34



〔図11〕 su^+ 菌でのホストCの検出。

UV r^- でない su^+ 菌にUV照射し、 $\phi 80$ 野生株を感染させた。菌液を ^{35}S -メチオニンでラベルしSDS-PAGEのアクリルアミド電気泳動法(15%)により分析した。(a) 594(su^-), (b) CA5013(su_1^+), (c) C600S(su_2^+), (d) Ymel(su_3^+), (e) BT63(su_6^+), 各レーンの左側は宿主菌の示した(マニ)を感染させている。UV照射は10800erg/mm 2 である。

が図12 と表-4 である。表-4 はデンシトメリーでの、各バンドの面積とそれらの面積の和に対する、それぞれのバンド面積の割合を%で示してある。表4のφ80野生株の段を比較すると明らかなように、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 U (su^- 10.9% / su_3^+ 8.4%) など su^- 菌、 su_3^+ 菌で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 のタンパク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^+ 菌ではカプルスより大きい 34K のバンド C が合成されていると考えられる。従ってカプルスより RNA 量が十分でないで、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^+ 菌の種類によつてバンド C (34K) タンパクの量が異なることも、そのよう RNA 量と関係しているかも知れない。

第 = に、φ80sus620 を su^- 菌と su_3^+ 菌に感染させた場合、major 36

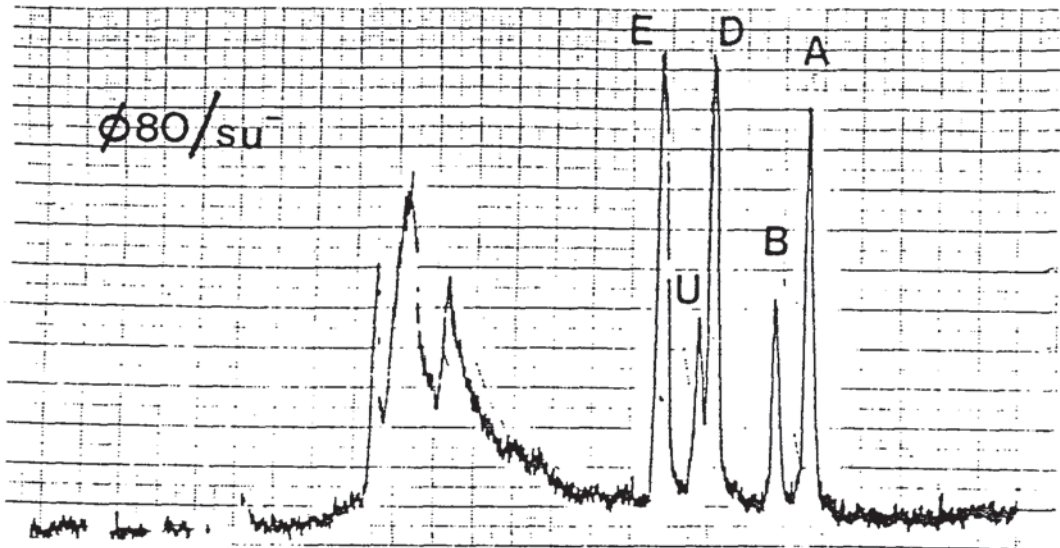
バンド A (su^- 7.1% / su_3^+ 8.7%), バンド B (su^- 2.2% / su_3^+ 4.0%),
バンド D (su^- 29.1% / su_3^+ 30.3%), バンド E (su^- 45.1% / su_3^+ 41.0%)
などは、量的にも su^- , su_3^+ で変化がなく、これらの中に $sus620$ 変異を起
した遺伝子30の産物が含まれていないことがわかる。 su^- 菌では検出できず、
 su_3^+ で出現するタンパクは前述のバンド C (34k) 以外に一本だけ見られる。
図・10-dの低分子量領域に見られるバンドがそれである。分子量は約10k前後
であると考えられる。この領域は電気泳動の先端になり、また宿主マウス由来
のポリペプチドが混在するため判定がむずかしいが、他の実験法同様に
 su_3^+ で濃くなるバンドが10k前後に見られるため、このバンドが遺伝子30産物
である可能性はありとされる。

第三に、非常に注目すべき結果として、 $\phi 80$ 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
 $sus620$ 変異におてバンド 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、これ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 U の
タンパクは逆に $sus620$ 変異により合成が 2.7~3.6倍に増加していた。 37

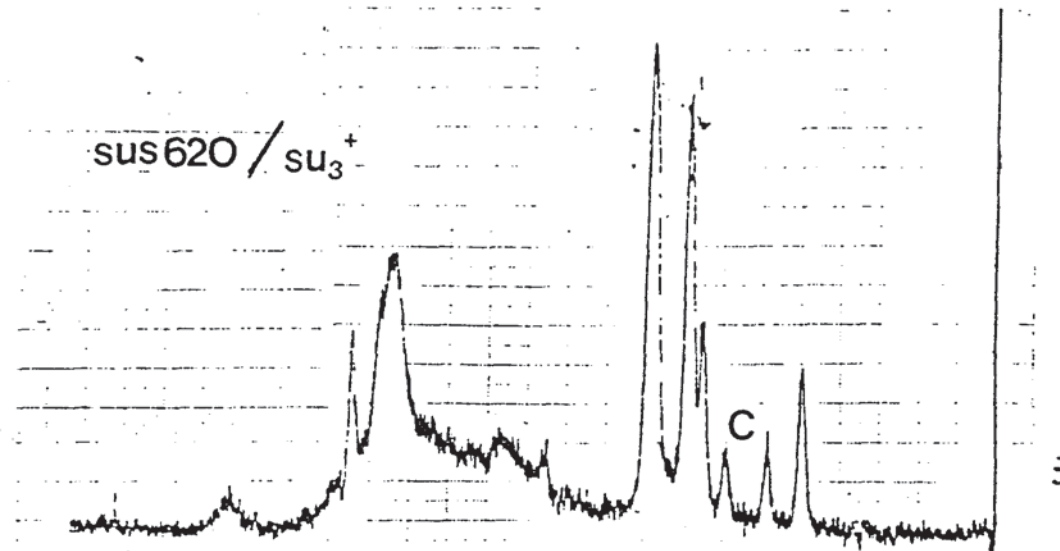
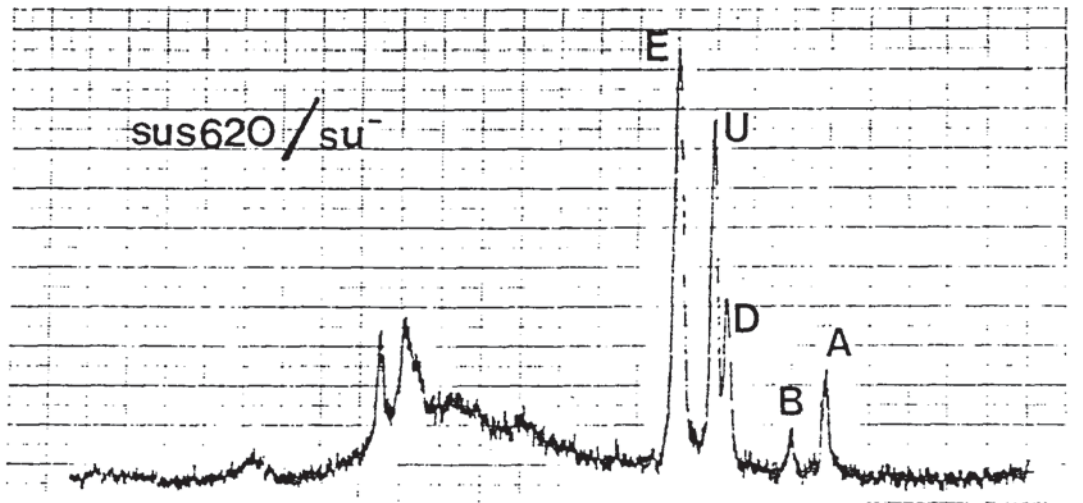
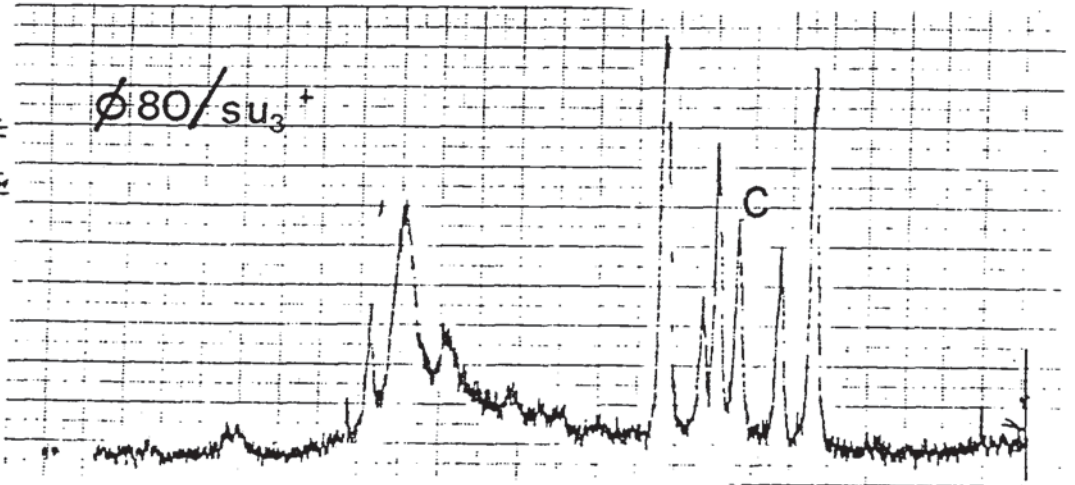
さらに図12ではバンドE(25K)として sus620変異で量的に余り変化していない(1.4~1.6倍)タンパクがあるがこれは1本のバンドではなく図27fgに見られるように分子量がほぼ等しい泳動条件によって微妙に分かれてくるバンドE(25K)とバンドV(26K)の2種類のタンパクから成ることがわかった。このうちバンドE(25K)は図27fのように sus620変異で減少し、またバンドV(26K)は逆に増加するため、図12ではそれらの合計として見かけ上、変化なく見えたと考えられる。また sus620変異株では su⁻菌、su₃⁺菌ともに20Kの位置に新たなバンドが出現した。これをバンドWとした。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 su₃⁺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]

φ80野生株と
φ80sus620
変異株のタンパク
の電気泳動の
—



[図11]で得られた
ラジオオートグラムを
デンストメーターで
測定したグラフで
ある。
泳動は図の右
から左に行なつた。



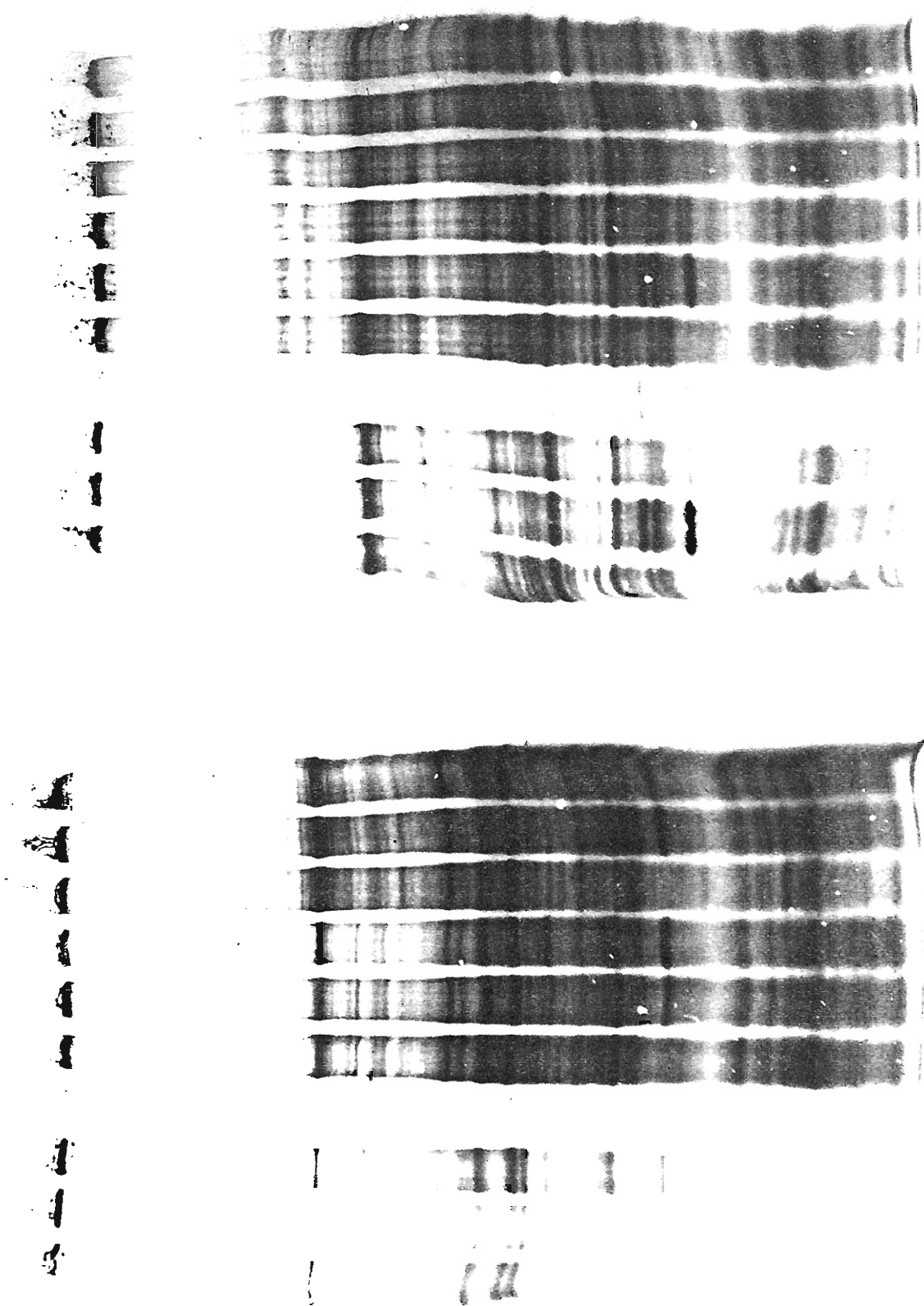
[表4] $\phi 80$ 野生株と $\phi 80sus620$ の初期タンパクの量的比較

protein bands		E (V)	U	D	C	B	A	
mol.weight		25K(26K)	29K	31K	34K	40K	45K	total
$\phi 80wild$	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%)
$\phi 80gene30$ $sus620$	su^-	28.4 (45.1%)	18.3 (29.1%)	10.3 (16.4%)	-	1.4 (2.2%)	4.5 (7.1%)	61.0 (100%)
	ratio	x1.54	x2.67	x0.62		x0.22	x0.30	
	su_3^+	36.9 (41.0%)	27.3 (30.3%)	11.8 (13.1%)	3.1 (3.4%)	3.6 (4.0%)	7.8 (8.7%)	90.4 (100%)
	ratio	x1.39	x3.61	x0.80	x0.28	x0.38	x0.38	

[表-4]の説明, 図15のデンス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帯を作っているため, 量的比較は, Eバンド(25K)以上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。 $\phi 80 sus620$ については ratio の段にそれぞれの宿主菌(su^- , su_3^+)について, $\phi 80$ 野生株のバンド割合との比を示した。

で減少するオパロンに属することを示しており、バンドCとバンドDがアンバー
コードでつながっている可能性を裏付けるものである。

このように UV 照射大腸菌を用いて検出で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はどのように発現して
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
カザミノ培地で大腸菌159を培養し集菌して HF基本培地に懸濁した
後、UVを照射せずに $\phi 80$ 野生株、 $\phi 80s\omega 620$ 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ったが、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 $\phi 80$ 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照射大腸菌で検出できた major なバンド (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 40K, 27K, 23K, 20K, 11K
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 , フェーンタンク形成の経時変化.

UVを照射していない大腸菌に $\phi 80$ 野生株, $\phi 80_{sus620}$ 変異株を感染させてきたタンク (159)

クを 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レーンが1組になっていて、感染後、図の下に示し

た時刻に5分間 ^{35}S -メチオニン $10\mu Ci/ml$ でラベルした。各レーンについて、左側はフェーン

を感染させない場合の宿主タンクのパターン、中央は $\phi 80_{sus620}$ 変異株を moi 50 で感

染させた場合のパターン、右側は $\phi 80$ 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 $\phi 80$ 野生株

のタンクパターンを示した。感染後90分の $\phi 80$ 野生株のタンクパターンは矢印で

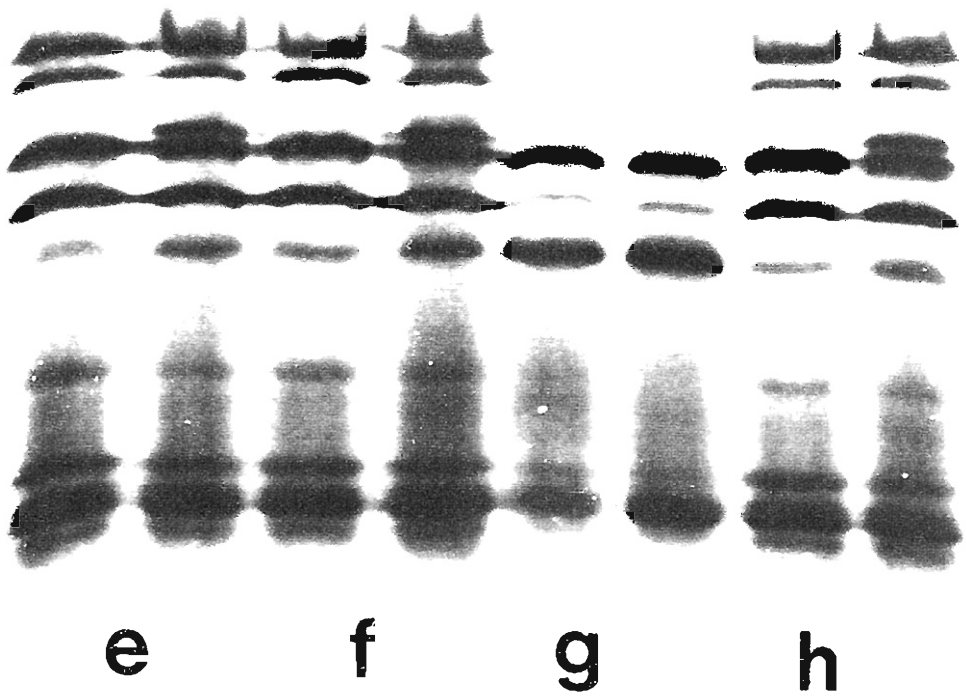
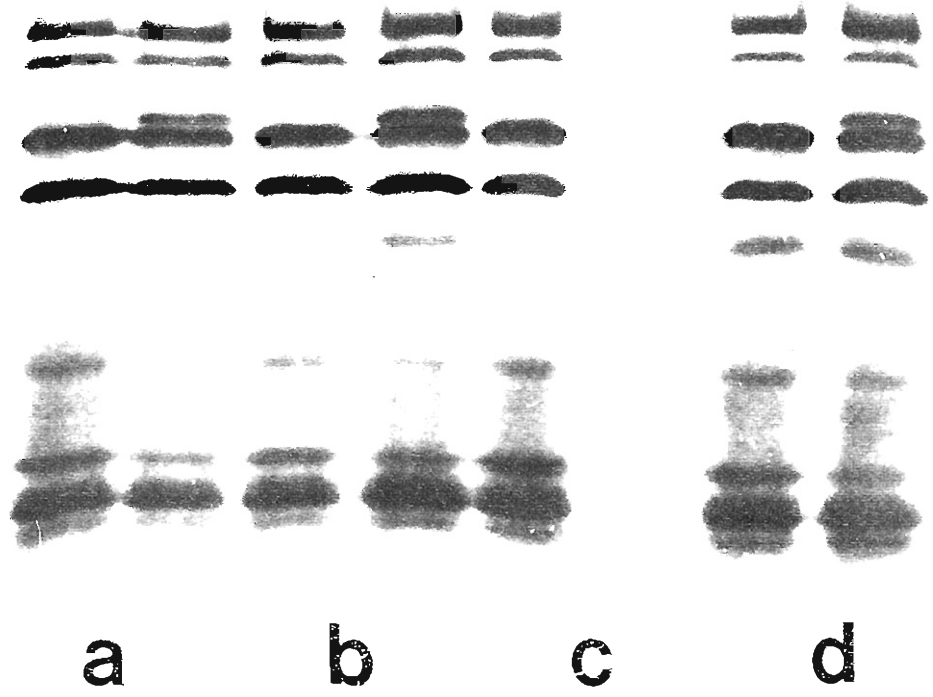
示したバンドは、感染後60分ぐらいから出現してくるフェーン後期タンクである。

大腸菌にファ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産生されていることを示している。そしてこれらの合成は、30分ぐらいで停止し、別のタンパク分子種の合成にとって代わられることから、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分でこれらの合成もなくなるが、φ80 野生株で見られたような新たな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と対応する。UV照射大腸菌で検出できた初期タンパクが φ80 遺伝子マップ上でど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与する遺伝子領域 _____ 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考えられる領域は、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, 17¹⁸⁾ 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 にマ

マップとその結果を示した。図 14 についてレーン(a)は遺伝子15のアナ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ナー突然変異株sus250, (c)は遺伝子14(λの遺伝子Pに相当)のアナー突然変異株sus8, (e)は遺伝子16のアナー突然変異株sus258, (f)は遺伝子17のアナー突然変異株sus146, (d)(g)はφ80野生株。(g)は遺伝子30のアナー突然変異株sus620のタンパクパターンを示してある。各レーンの左側は宿主にsu⁻菌であるN3-1(su⁻)を用いた場合、右側はsu₃⁺菌であるN3-1supF⁻(su₃⁺)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のいずれのアナー突然変異株でもそのタンパクパターンはφ80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su₃⁺において出現したのは前述の34K1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照射菌で検出された初期タンパク群に、このようなIの右近傍にマップされるDNA複製に関与する遺伝子産物は含まれていないことがわかった。従っ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、元来その合成量が非常に少なく、この条件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フェージ由来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



30_{cI}	15	14	16	17	
sus 620	sus 326	sus 250	sus 8	sus 258	sus 146

[図4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ハターン

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。レーン(a) sus326,

(b) sus250, (c) sus8, (d) (R) は $\phi 80$ 野生株, (e) は

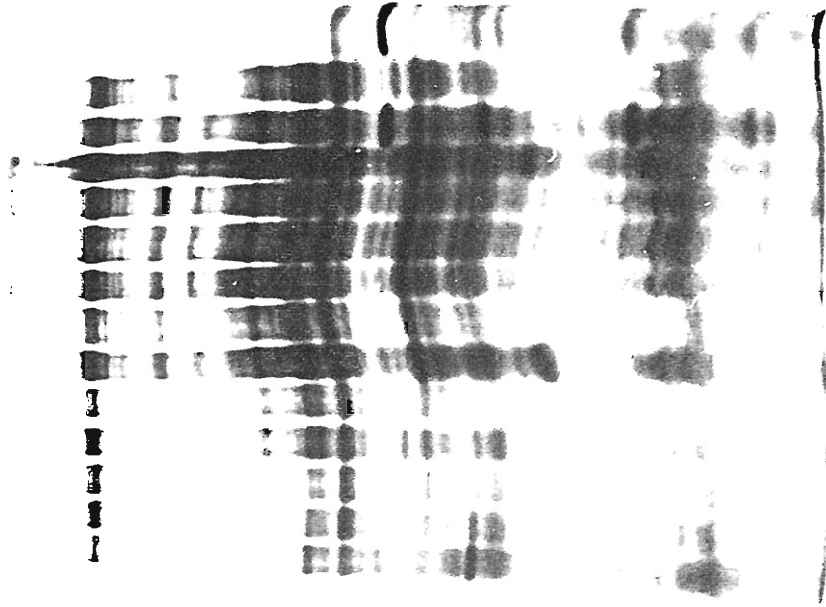
sus258, (f) sus146, (g) は sus620 のタンパクハターンである。

各レーンの左側はそれらのファージを su⁻菌 N3-1 に感染させた場合右

側は su⁺菌 N3-1_{supF} に感染させた場合のハターンである。

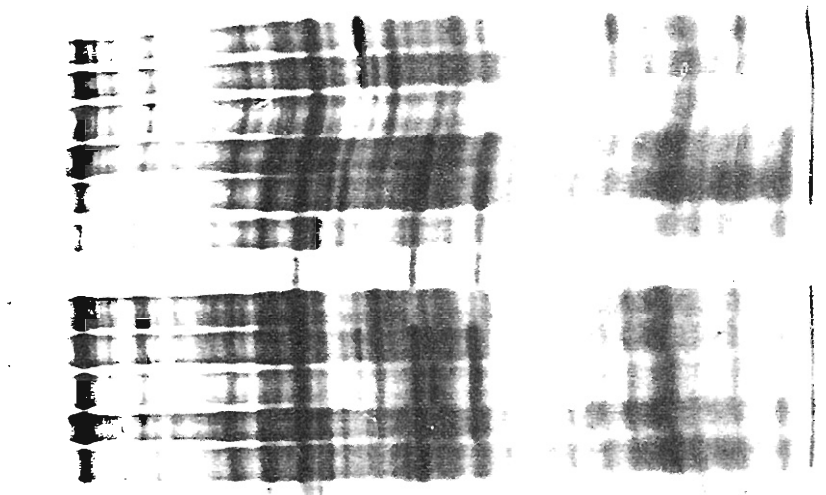
[圖15]

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15



U123456123456789

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15



123456U123456

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r
s
t
u
v
w
x
y
z

[図15]の説明

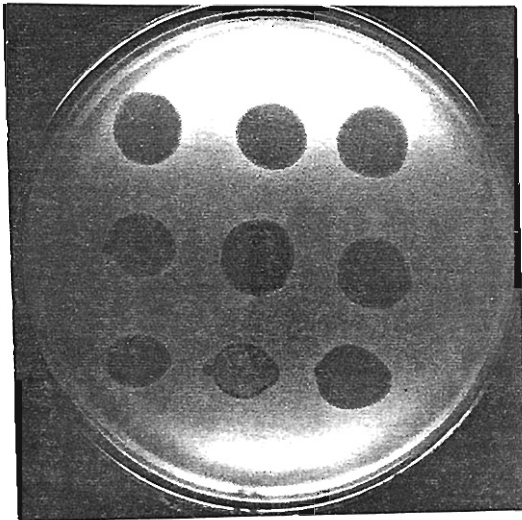
UVを照射せずに159に $\phi 80$ 野生株、 $\phi 80$ sus 620 変異株を感染させ、ラベルしたタンパクを電気泳動で解析した。図5には(a) $\phi 80$ sus 620 変異株、(b) $\phi 80$ 野生株、(c) $\phi 80$ を感染させた場合、三つの場合についてのタンパクを示した。各パターン(a), (b), (c)の内では1は感染後0分、2は10分、3は30分、4は45分、5は60分、6は90分後にラベルされたタンパクである。UのレーンはUV照射菌に $\phi 80$ 野生株を感染させた時のパターンである。(d)は種々のアンバー変異株を感染させた後、90分後に ^{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 $\phi 80$ 野生株を感染後90分でラベルした場合、(d)-8は $\phi 80$ を感染させずに90分間ラベルした場合、(d)-9はUVを1分照射後 $\phi 80$ 野生株を感染させ、90分間にラベルした場合のタンパクパターンを示してある。

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ったことから、60分以降に検出され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、これらは後期の頭部または尾部タンパクであると考えられる。

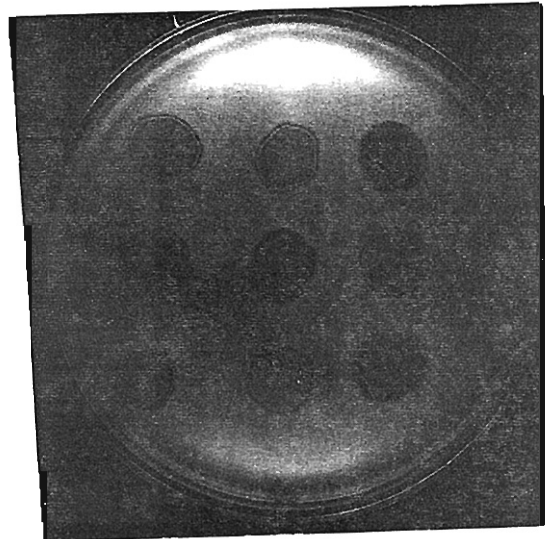
(b) immunity 領域 _____

(1) 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. $\phi 80$ cI 変異株として cI₄ がよく用いられるが、これは cI 遺伝子のアンバー突然変異となりため、タンパクバントの消失が期待できないし、結果はホトホトが実際、野生株と異ならなかった。cI, cII タンパクを固定する目的でこれらのアンバー突然変異株を単離した。これらの変異株は su^- 菌ではクリアフラックを形成し、 su^+ 菌ではタービッド (turbid) なフラックを形成した。cI₄ との相補性試験により、cI アンバー突然変異体である cI_{am} 7, cI_{am} 8, cI_{am} 26 と、cII アンバー突然変異体である cII_{am} A, cII_{am} E 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 N3-1 $supF^-$ 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 $\phi 80$ 野生株のパターンと変わるものはなかった。(図 17) よって major な初期タンパクは cI, cII

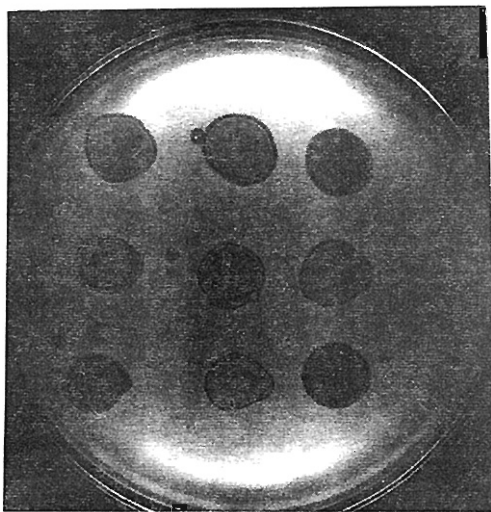
[16]



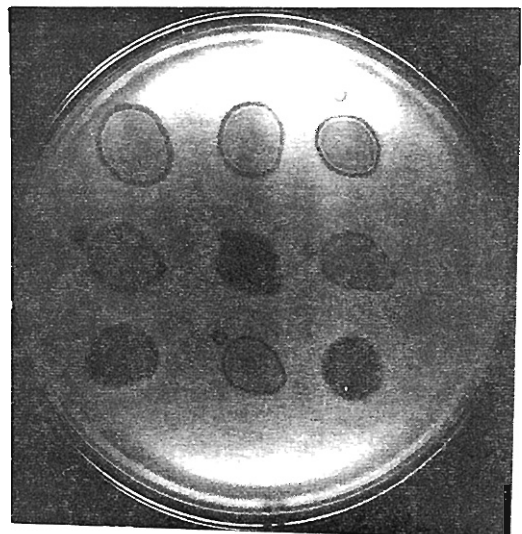
594



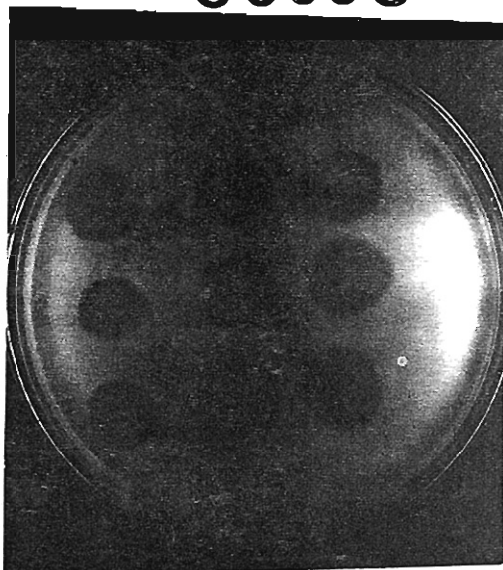
CA5013



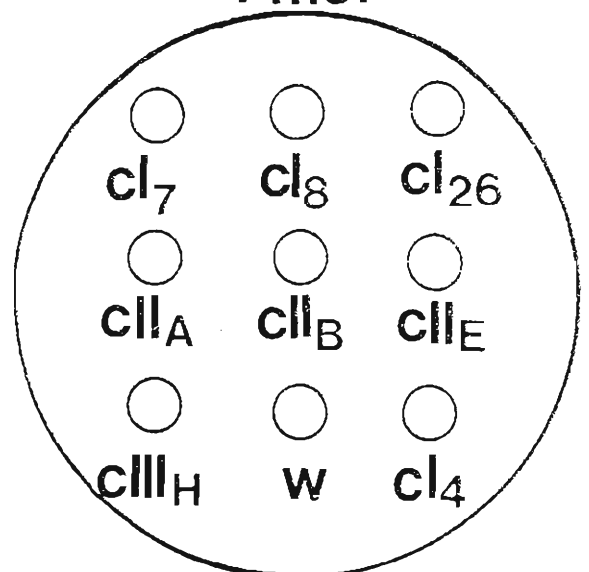
C600S



Ymel



BT63



〔図16〕の説明. クリアー-ア-バー変異株の性質.

図に示した大腸菌, 594 (su^-), CA5013 (su_1^+), C6005 (su_2^+), Ymel (su_3^+), BT63 (su_6^+) を T2 プレートにまき. その後, 単系培養したクリア変異株を約 $10^8/ml$ 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-バー変異株であることがわかった.

[表5] $\phi 80cI$ アンバー突然変異株

$\phi 80cI$ amber mutants			
strains	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
Yme1 (su_3^+)	t	t	t
N3-1supF ⁻ (su_3^+)	t	t	t
BT63 (su_6^+)	c	c	(c)

種々の SU^+ , SU^- 菌を T₈ プレートに軟寒天とともにまき、約 10% の

ファージをその上にスポットして、1夜培養後、クリアかタービッドを判断した。

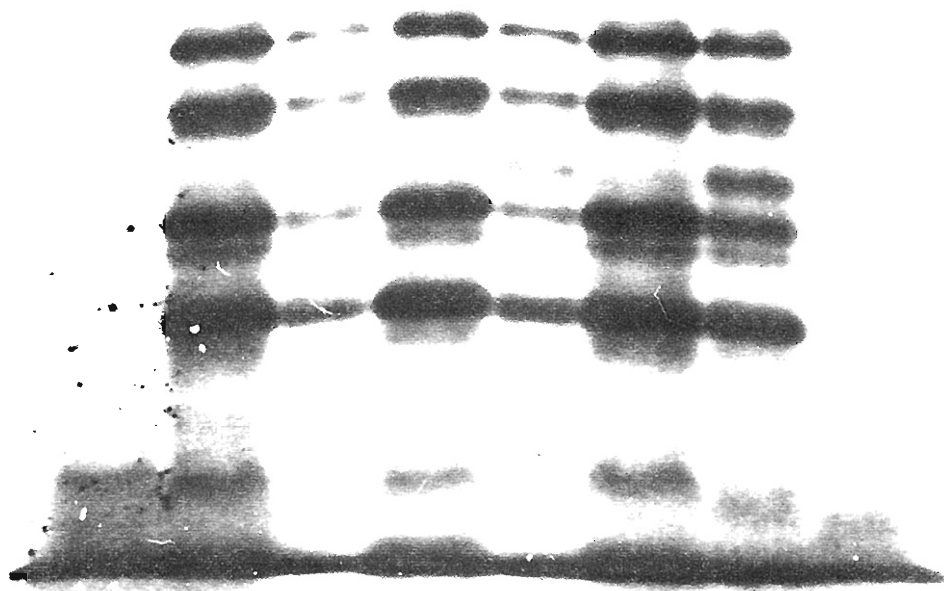
t:タービッドスポット, c:クリアスポット, 37°Cで培養した。

[表6] $\phi 80cII$ アンバー突然変異株

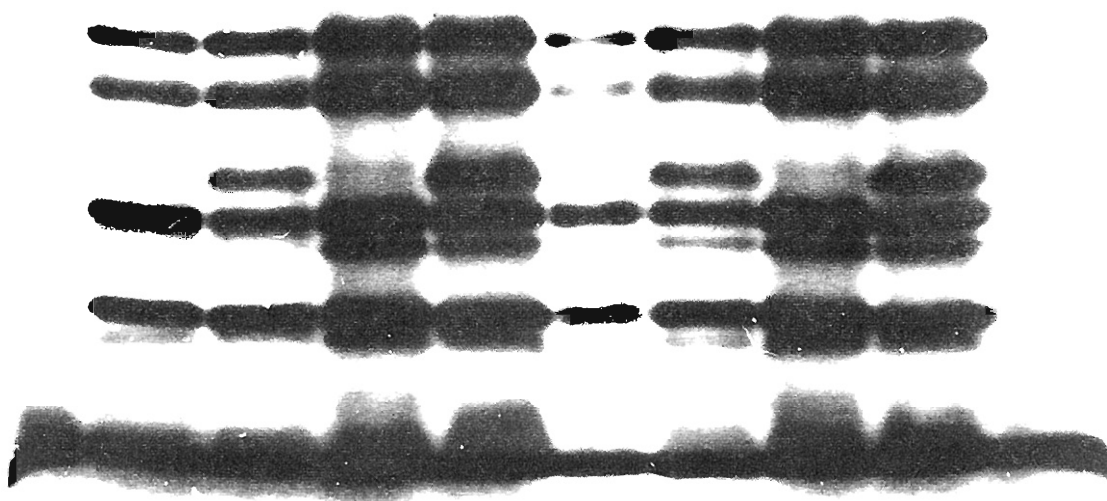
$\phi 80cII$ amber mutants		
strains	cIIamA	cIIamB
HfrH (su^-)	c	c
594 (su^-)	c	c
CA5013 (su_1^+)	t	c
CA161 (su_2^+)	t	t
Yme1 (su_3^+)	t	c
BT63 (su_6^+)	t	c

[表5]と同様の方法で調べた。

[17]



cl₇ cl₈ cl₂₆



cl_{III}_H cl_{II}_A wild cl_{II}_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タンパクを同定する目的で cI アニバー変異株
を NB-1 (su-) と NB-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 Φ80cIam7, Φ80cIam8
cIam26, cIIamH, cIIamA, cIIamE 7, Φ80 野生株を対照に用
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 な初期タンパクに比べて、非常に低いということがわかった。

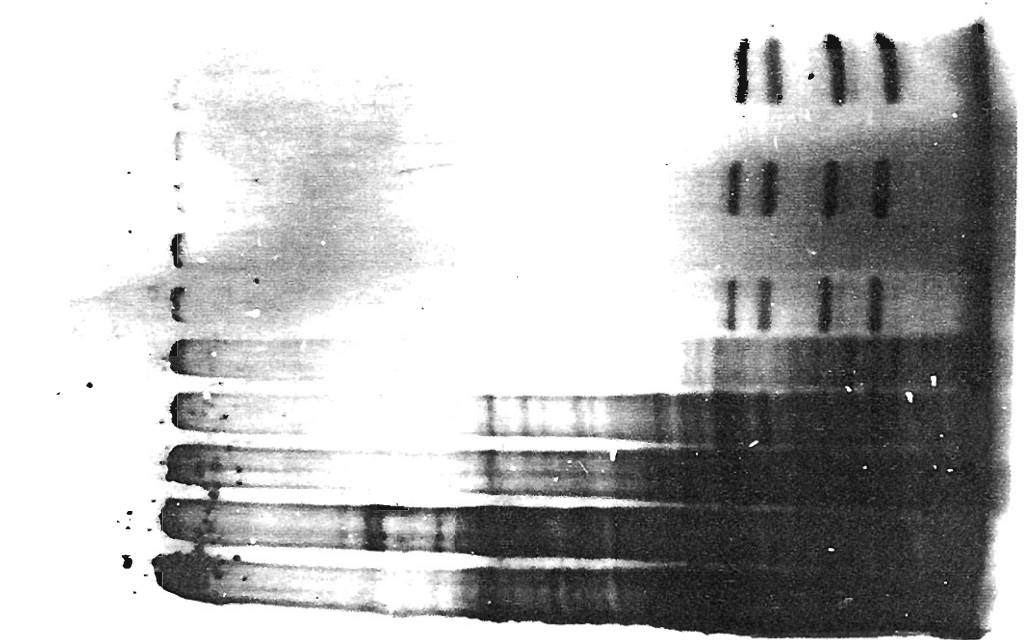
(ii) $\phi 80$ cItsG 溶原菌中でのファージタンパク合成。このような低レベルのcIタンパクを測定する目的で、 $\phi 80$ の溶原菌に $\phi 80$ 野生株をUV照射後、追加感染させ、できるタンパクを電気泳動法により分析した。入ファージでは λ ind⁻を溶原化させたUV感受性大腸菌に入ファージを感染させると、溶原化しているファージ遺伝子から合成されたcIリプレッサーにより追加感染したファージのOL、ORのオペレーターが抑えられ、cI-rex遺伝子のみ転写されるためレベルはcIとrexタンパク

16)

に取込まれることがわかっている。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ファージ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 $\phi 80$ cItsGを用いた。 $\phi 80$ cItsGはcIリプレッサーが温度感受性で35°以上で高温による誘発を受ける。このファージは同時にまたUVind⁻の性質をもつことが知られている。UV感受性大腸菌159に $\phi 80$ cItsGを30°で溶原化させ、UVを照射後、 $\phi 80$ 野生株および $\phi 80$ V₂を感染させ、³⁵S-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対照である。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¹⁴C-ロイシンの取込みで調べたように、宿主

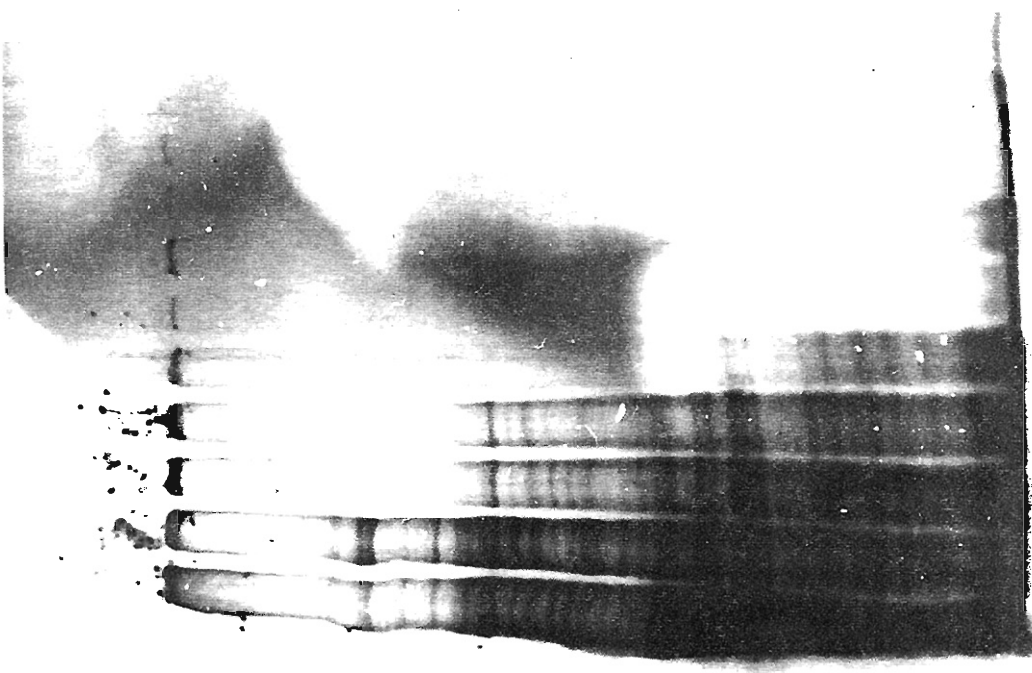
タンパク合成の低下が見られる。しかしUV照射時間が1分から9分にかけて
ファージ由来のタンパクは宿主ほど減少せず、クリアなバンドとして残った。次に $\phi 80cI_{tsG}$
を159に溶原化させた菌に $\phi 80$ 野生株を感染させたのが、図18-bである。
同様に、UV照射量を増すと宿主タンパクの減少が見られたがファージタンパクは
検出できなかつた。さらにもう一つの対照として、159の $\phi 80cI_{tsG}$ 溶原菌に $\phi 80V_2$
を感染させたのが図18-cである。この場合は図18-Qと同様に1分から9分間
のUV照射でファージタンパクが明瞭に残っているのがわかる。以上のことから次のこ
とがわかる。第一にこの $\phi 80cI_{tsG}$ を溶原化させた大腸菌159にUV照射
(9分間まで)してもファージタンパクは検出できる。溶原化したファージが紫外線
により誘発されてファージ特異的タンパクを作ることはないということである。第二に
この溶原菌中で $\phi 80$ 野生株はプラーンを形成しないが、それと対症して、ファージ特
異的の major タンパク合成もなかつた。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が変
(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ド
ファージとして $\phi 80V_2$ があるが、これはファージの初期遺伝子発現を調節するオペレー
構造が変化し、リアプレッサーの結合を阻害する変異株と考えられる。このビルド



0' 1' 3' 5' 9'

159 ← $\phi 80w$

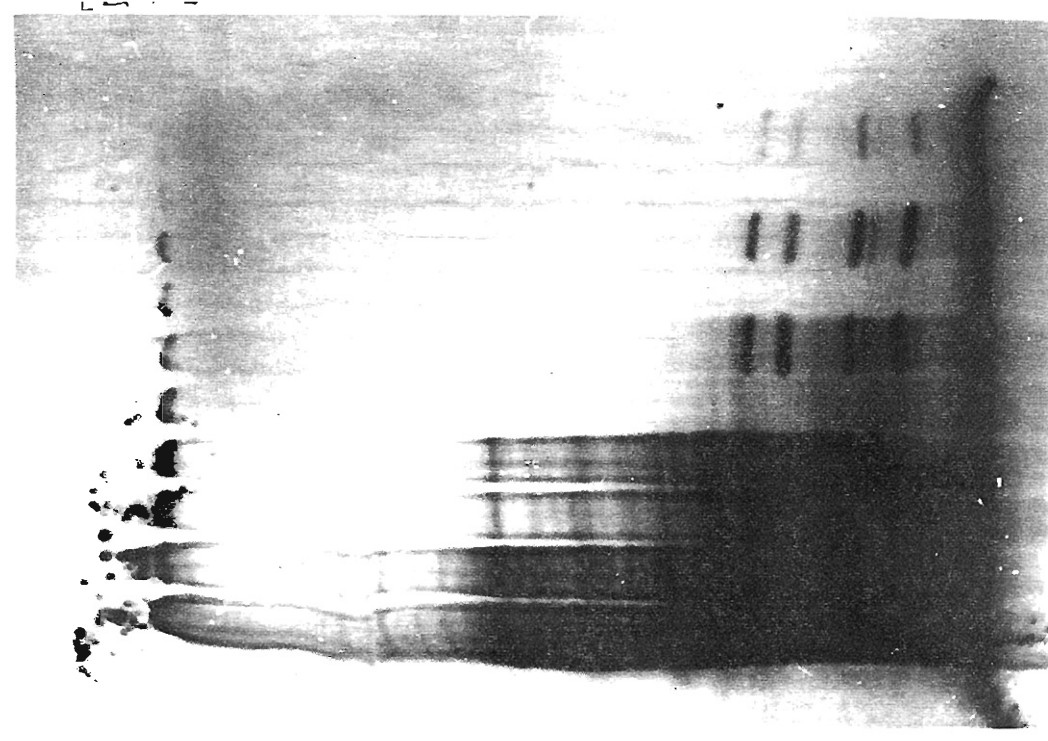
a



0' 1' 3' 5' 9'

159($\phi 80$) ← $\phi 80w$

b



0' 1' 3' 5' 9'

159($\phi 80$) ← $\phi 80V2$

c

[図18] の説明 $\phi 80cI_{18}G$ 溶原菌に $\phi 80$ が感染した場合合成されるタンパク

uvrA⁻ 大腸菌に $\phi 80cI_{18}G$ を溶原化させ、これに $\phi 80$ 野生株を追感染させて、

³⁵S-メチオニンでラベルされるタンパクを分析した。(a) 非溶原菌 159 に $\phi 80$ 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た。各UV

照射のレーンについて、左側は宿主のタンパクパターン、右側は $\phi 80$ 野生株を

感染させた場合のパターンである。(b) $\phi 80cI_{18}G$ を溶原化させ、これに 0分、1分

3分、5分、9分間 UV を照射したのち、 $\phi 80$ 野生株を m.o.i. 50 で感染、非感染

し、タンパクパターンを分析した。(c) $\phi 80cI_{18}G$ を溶原化させ、これに 0分、1分

3分、5分、9分間、それぞれ UV を照射したのち、 $\phi 80V_2$ (ディルレント) を m.o.i.

50 で感染させラベルされたタンパクを分析した。

ファージの $\phi 80$ cI to 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、ヒ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、溶原菌中にも合成されているはずの cI あるいは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タンパクを検出するための工夫を行った溶原菌検出できるポイントが示された。

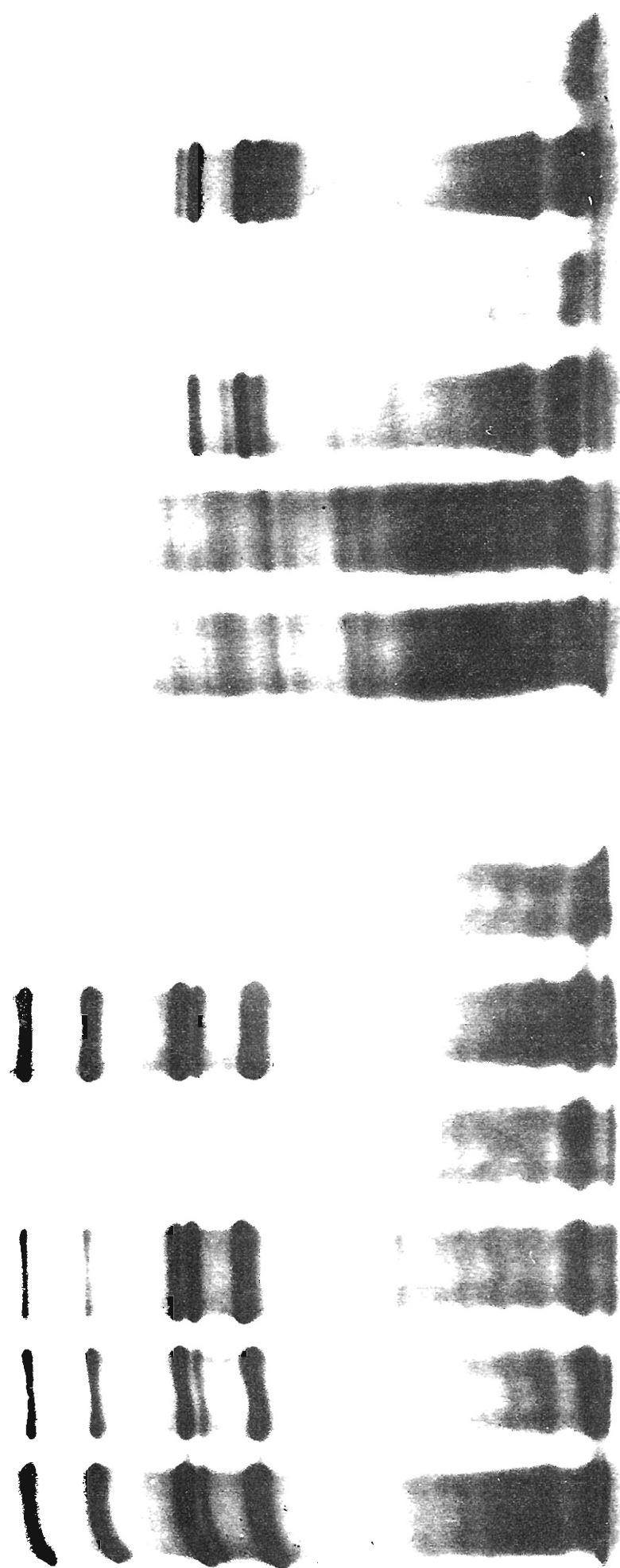
(c) cI の左近傍にある組換えに関与する遺伝子領域

(1) 欠失変異株の単離。

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 cI, cII, cI 領域の右近傍の複製に関与する領域、後期の遺伝子産物でないことがわかった。したがってこれらをサポートしている可能性がある領域は cI より左側のファージの組換えに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組換えに関与し、正常な欠失株では、これらの遺伝子がミスセンス、ナンセンス、欠失などの変異を起こしていても増殖できる必須でない遺伝子であるため、sus 変異株は単離されていない。しかし欠失変異株で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単離を試みた。

入や $\phi 80$ 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

19) 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



V2 sus620 wild A4 A4sus620

[図19] の説明, $\phi 80cI_{ts}G$ の溶原菌に種々の $\phi 80$ 変異株を感染させた場合

合成されるタンパクのパターン

$\phi 80cI_{ts}G$ の溶原化した大腸菌と, 非溶原菌 159 に, $\phi 80$ 野生株, $\phi 80sus620$,

$\phi 80V_2$ (ビルレント), $\phi 80\Delta 4$, $\phi 80\Delta 4sus620$ を感染させ合成されるタン

パクをラベル分析した。大腸菌, 溶原菌, 非溶原菌ともに UV を 3 分間照

射した。ファーシ"を感染させない。両方の菌の対照を中央 (一の印) に示した。

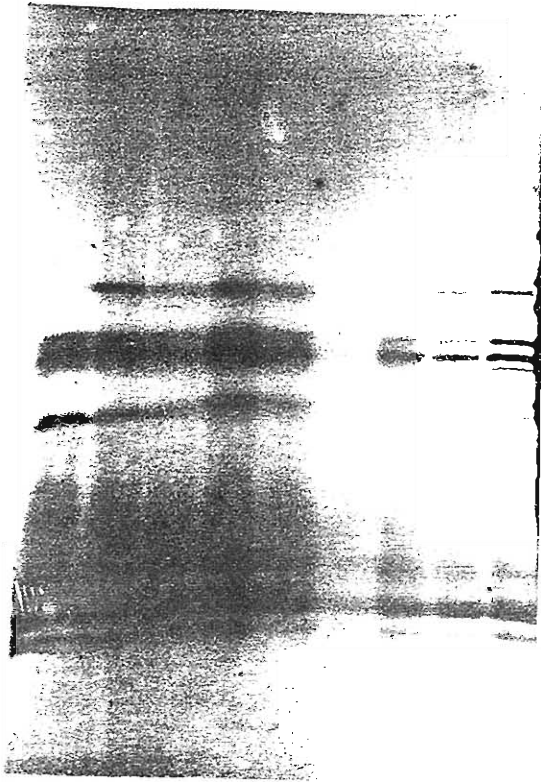
各試料とも左側に非溶原菌の, 右側に $\phi 80cI_{ts}G$ 溶原菌でのファーシ

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 分で行った。

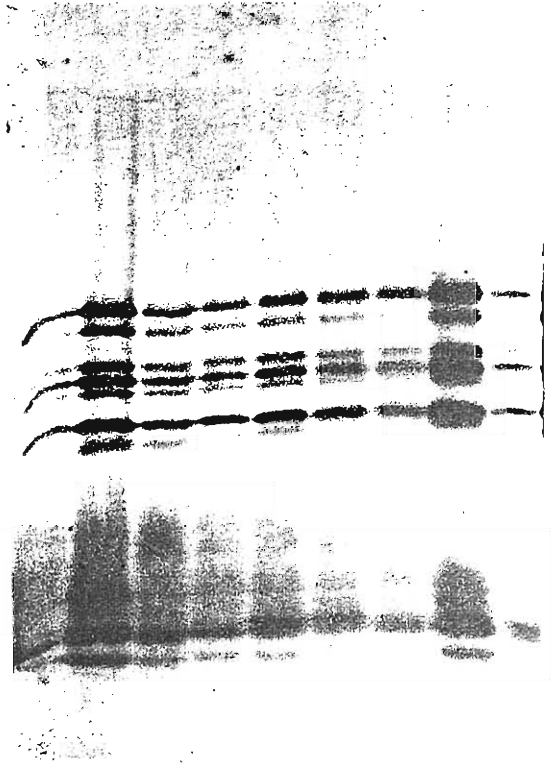
がくずれ、内部のDNAが外に出るためである。ところが欠失変異株の場合、内部のDNA鎖が短かいため、EDTA熱処理に対して、野生株より安定な性質をもつ。この方法でφ80野生株よりspontaneousに出現した欠失変異株を選択した。

φ80野生株 ($5 \times 10^{10}/\text{ml}$) を20mM EDTA, 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 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。この処理によりファージ濃度は 6×10^5 低下した。生き残ったファージをC600SとともにT₁プレートにまいて、一度増殖させ、T₁バッファーで抽出した (1×10^{11} ファージ/ml)。これをもう一度、20mM EDTA, 60° 1時間の熱処理を行なうとファージ濃度は 8×10^3 低下した。こうして2回のEDTA熱処理に耐えたファージをC600SとともにT₁ plateにまき、単一コロニーを単離した。これらのファ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 (f_{ec}現象) によってある程度判断できる。単一にいたるファージをC600SとC600S recA⁻ 菌をそれぞれ、まいたT₁プレートに、セル利L.37°で一晩培養後、ファージ増殖を比較した。単離したファージはすべてC600Sで増殖するが、C600S recA⁻ 上では、そのコロニー形態、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個のコロニーは (i) タイプA, タービットで増殖がよい 103個, (ii) タイプB, クリアで増殖がよい 40個, (iii) タイプC, 非常にクリアで増殖がよい 23個 (iv) タイプD, 増殖が悪い 18個, (v) タイプE, C600S

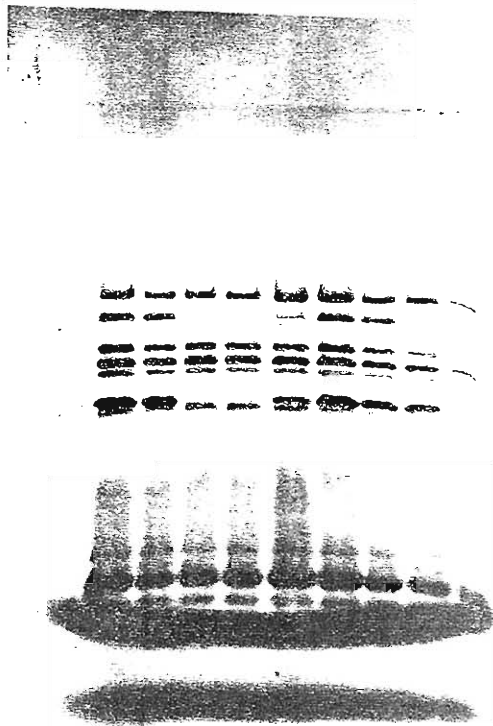
recA⁻では増殖できない 2個 に分類できた。この5つのタイプからそれぞれ約10個の
ファージを選び、それらを UV照射大腸菌 NB-1 supF⁻ (su3⁺) に感染させて、タンパク
ターンを調べたところ図 20 のようになった。タイプ Bは φ80 野生株のパターンと
同じであったがその他の タイプ A, C, D, E, についてはそれぞれ独特の欠失したパターンを
示すファージが含まれていた。これらの新たに単離された欠失変異ファージを 図 20 のよう
に Δ5, Δ6, Δ7, Δ8 とそれぞれ命名した。既に φ80 欠失変異株としては、山岸ら
により単離された Δ4, 今井らにより単離された Δ3 が知られている。また欠失とともに
大腸菌のトポトファンオペロンの組込まれた φ80 p_{cap} 190 R 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 Δ5 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 Δ6 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 ダルトンぐらい小さい位置 (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。Δ7 は バンド E, B, と A を全く欠失した



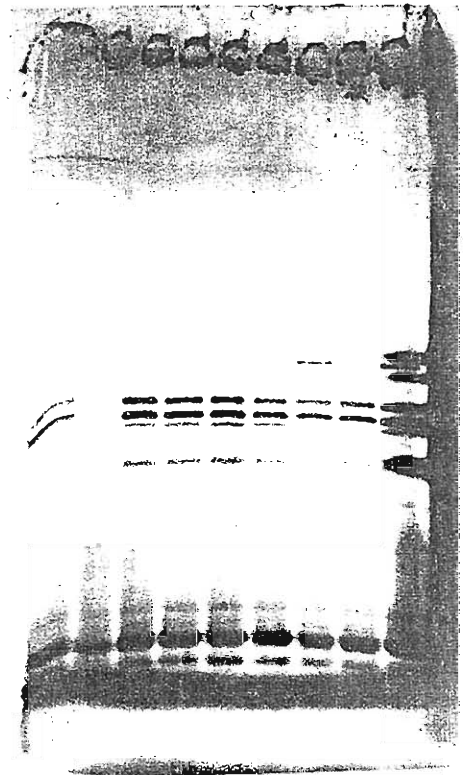
A



B



C



D



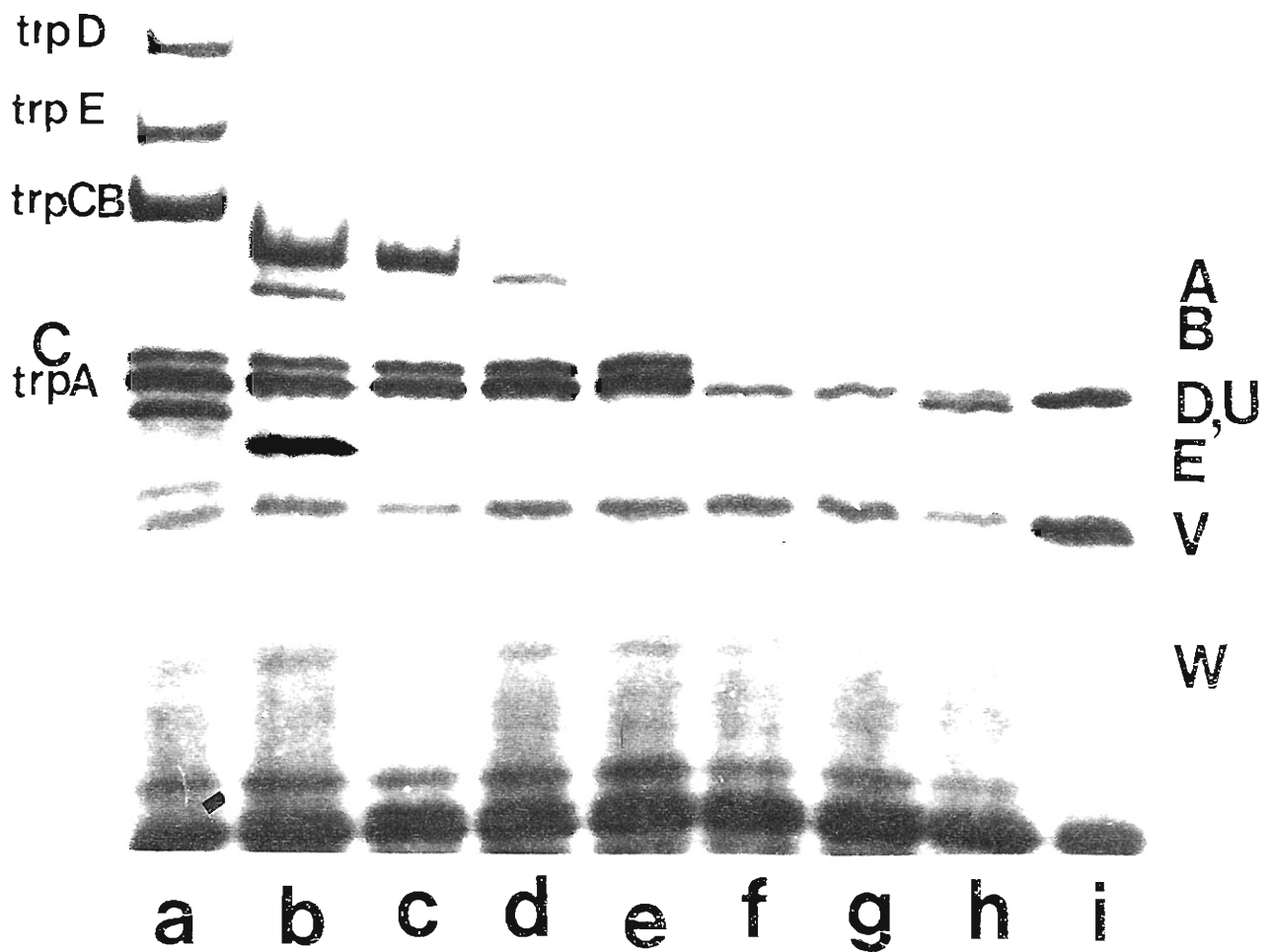
E

[図20], の説明. 欠変異株のタンパク分析.

EDTA 熱処理

単離した CG00SrecA 上でのプロテック形態によつて, A, B, C, D, E に分類した欠変異株を UV 照射した大腸菌 NB-1supF⁻ (su₃⁺) に感染させ, ³⁵S-メチオニンでラベルした後, ガル電気泳動でタンパクを分析した. 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. フェージの種類が多いため, 10¹²/ml のカラムのフェージを用意することはむずかしい. それでフェージ吸着は HF 基本培地ではなく, T₁ バッファー中で行なった. ~~単離~~した大腸菌 NB-1supF⁻ を T₁ バッファーで洗った後, 3 × 10⁸/ml の濃度に合わせ UV を照射した. 各種フェージのフレート溶菌液 (約 5 × 10¹⁰/ml) を T₁ バッファーで 200 倍希釈したものを 1 ml に, UV 照射大腸菌 0.1 ml (3 × 10⁹/ml) と 10 倍濃度の HF-20A (=) 取培地 0.1 ml, 10 μCi/ml の ³⁵S-メチオニンを加えて 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 のフェージを, B はタイプ B, C はタイプ C のフェージ, D はタイプ D のフェージ, E はタイプ E のフェージのタンパクパターンを示した. 矢印は特徴的なタンパクパターンをもつフェージとして単離したものである.

変異株であった。Δ8 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 も欠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 アパロコドン をはさんでコードされていると考
えられる。Δ4, Δ3 のタンパクパターンは Δ8 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 Δ3 は新たに 分子量
約 28,000 のタンパクがあり、Δ8 には分子量約 22,000 ぐらいのタンパクが検出
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
欠失変異株はそれぞれ バンド E, B, A, C, D などのタンパクを欠失していることがわかった
が、バンド U, V, (W) などのタンパクは欠失しなかった。U, V, W などのバンドを欠失
する変異株は、EDTA 熱処理を 65°, 70° に上げてき、φ80p SU₃⁺ など長い DNA
を持つフェージから選択しても 得られなかった。欠失する E, B, A, C, D が前述のタン
パク第 1 群で、欠失しないタンパク U, V, W が第 2 群に属することは、先に述べたニッ
コオパロンの存在可ることを強く支持するものである。λ フェージのように 組換えに関与
する遺伝子が オパロンを形成して左向き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さ
れらの右に存在可ると思われる。 図 21-2 には sus 620 変異株のタンパクを示し

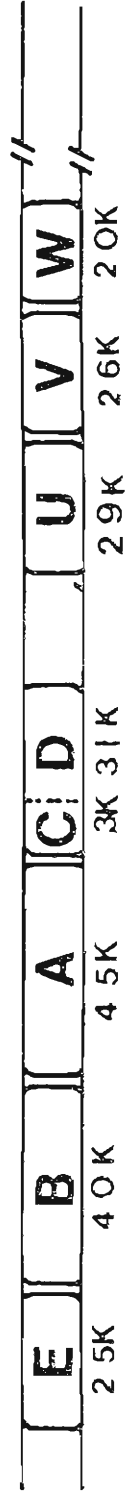


[図21] 欠乏変異ファージのタンパク質プロファイル

図22で得られた特徴的タンパク質の欠損を片断化して変異株を増殖させ
 再び、HF 基培地中で培養しその欠損の詳細を検討した。(a) ϕ 50
 pbrp190h, (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 80 sus620 変異株を大腸菌 NB-1supF⁻(sus₃)
 に感染させた。

[272]

Deletion mutants of $\phi 80$



$\Delta 5$

$\Delta 6$

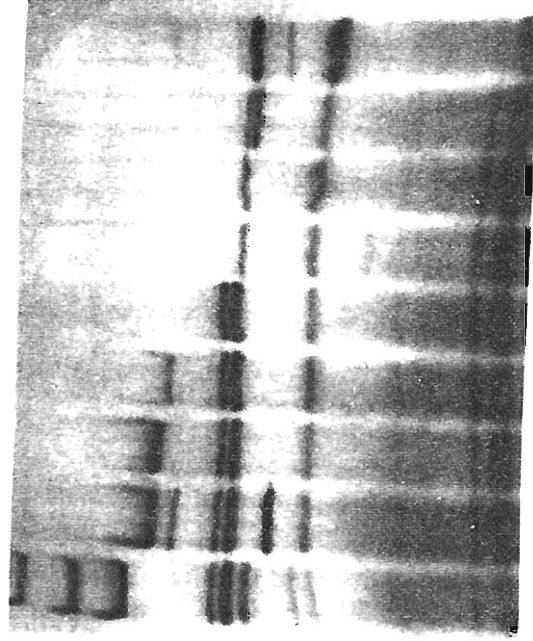
$\Delta 7$

$\Delta 8$

$\Delta 3$

$\Delta 4$

ptrp190h



190 h w $\Delta 5$ $\Delta 6$ $\Delta 7$ $\Delta 8$ $\Delta 4$ $\Delta 3$ sus 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, その箇所が欠失していることを示している.

バンドCとDはその間にアンバーコドンがあり, 続いて合成されるとCバンド

に写ることを表わしてある.

たが、 $\Delta 3, \Delta 4, \Delta 8$ に似ていることがわかる。また $\phi 80$ p\Delta T に相似していた。その他のトリア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ポイントが検出できた。65Kポイント (trp D に相当)²²⁾, 60Kポイント (trp E に相当)²²⁾, 46Kポイント (trp C, B に相当), 29Kポイント (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組換えに関与する

いくつかの性質を調べた。

(a) fec 現象 エアージでは組換えに関与する遺伝子群の中で red 遺伝子とそれに隣接する遺伝子に突然変異が起こると、 $rec A^-$ 大腸菌では増殖できない。この現象を fec と呼んでいいるが、 $\phi 80$ 欠失変異株にも $rec A^-$ 菌で増殖できないものがあり、 $\phi 80$ にほ入る red と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 大腸菌でのフラック形成効率を 1 とした場合の、C600S $rec A^-$ 菌での効率を示した。 $\Delta 3, \Delta 4, \Delta 8$, $\phi 80$ prec A^- のフラック形成効率が 10^{-3} 以下であり、fec⁻であった。一方 $\Delta 5$ はその比が約 0.8 であり、fec⁺であった。興味あることに $\Delta 6, \Delta 7$ はともに $rec A^-$ 菌でもフラックは約 0.2 の割合で形成したが、フラックが非常に小さくポイントのようであった。このことは欠失の程度と fec 現象が密接に関係しており、タンパクポイント A, 又は C, D が、red, r のいずれかに相当すると考えられる。 7

(10) red 遺伝子 λ の red 遺伝子はエキソヌクレアーゼと β という二つの遺伝子から成っており、いずれが変異しても、大腸菌 pol^- 株では増殖できない。φ801 についても red 遺伝子の存在は知られており、山口は red A と red B の二つのグループにその変異株が分けられ、red B の方がエキソヌク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、 $pol A^-$ 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 red A⁻ である red 12 変異株、red B⁻ である red 42 変異株との相補性試験を行なった。L-ブロスで培養した大腸菌 N6-11 ($pol A^-$) を集菌し (1×10^8 / ml)、これに相補性を調べる二種のファージをそれぞれ m.o.i. 5 で吸着、感染させた後、L-ブロスで 10^3 希釈し、それを 37°、150 分振盪培養後、594 及び $pol A^-$ 菌 N6-11 上でファージ深度を測定した(表 8) その結果、red A⁻ である red 12 と red B⁻ である red 42 は明らかにコンフリクトしたが新たに単離した Δ5, Δ6, Δ7, Δ8 及び Δ3, Δ4, φ80 ptrp 190h は red 12, red 42 のいずれともコンフリクトしなかった。このことは調べた欠失変異株がすべて red A, red B の両方の遺伝子を欠失、または機能できない状態に付していることを示している。

また、red B 遺伝子はエキソヌク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、エキソヌクレアーゼ活性を調べた。活性は 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 $polA^-$
$\phi 80_{wild}$	0.65		0.23
$\phi 80_{red12(A)}$	1.0		$< 10^{-3}$
$\phi 80_{red43(A)}$	0.73		$< 10^{-3}$
$\phi 80_{red22(B)}$	0.73		$< 10^{-3}$
$\phi 80_{red42(B)}$	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^-	$< 10^{-5}$
$\phi 80_{ptrp190h}$	$< 10^{-3}$	fec^-	$< 10^{-5}$

単離した欠失変異株や $\phi 80_{red^-}$ 株を, C600S $recA^-$ + N6-11 $polA^-$ ととき

にまき, C600S でのカバレッジを 1.0 とし, $recA^-$ 菌, $polA^-$ 菌でのプレート

効率を測定した。すなわち, $\Delta 7$, $\Delta 6$ のプレート効率は C600S の約 2~3割に

あるが, そのプレート効率が非常に小さい pin point であるので fec^{\pm} とした。

[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 ptrp190h	167 (0)	334 (0)	380 (0)

実験の詳細は本文参照。大腸菌 N6-11 pol A⁻ 中で各ファージをそれぞれ

増殖させ、希釈後、C600S および 594 上でカッパを測定した。これが対照

である。カッコ内には、N6-11 pol A⁻ 上で測定したカッパを示してある。この数は

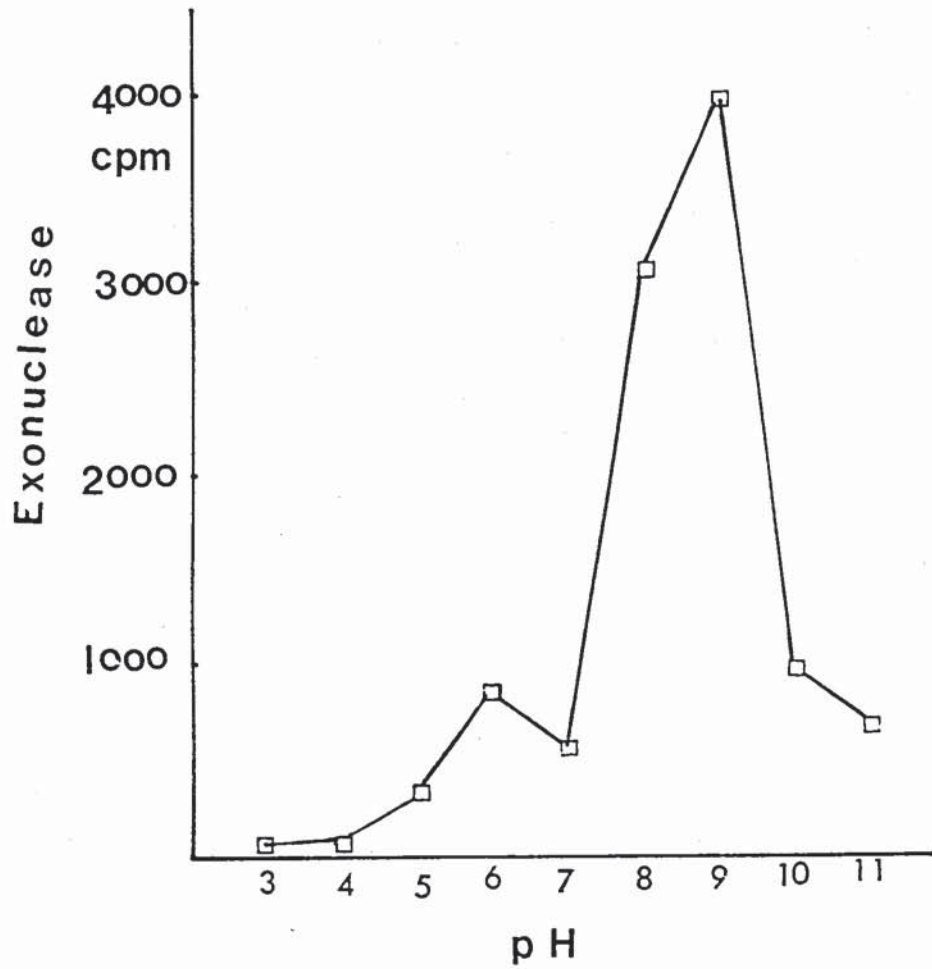
相補性を調べる=種のファージ間の組換え体の出現頻度を表わしている。次に

red12(A), 又は red42(B) を加えて、pol A⁻ 菌内でのファージ増殖を調べた。

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

は red12(A) と red42(B) とは相補性のないことがわかる。

方法に従って測定した。 ^3H -チミンでラベルした大腸菌 594 Thy⁻のDNAを Smithy 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 μg DNA/ml, 7×10^3 cpm/ μl), 大腸菌 tRNA 5 μl (10^{-5} M), フェージ溶菌液 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 犏牛胸腺 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。低速遠心で沈殿した DNA を除き、上清 0.5 ml を Triton X-100 - Toluene (1:1) の系に加えて、液体シンチ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 の小さなピークの活性はエキソヌクレアゼの不活性な red B⁻ 変異フェージ red 42, red 22 での野生株と同じ程度の活性を示すことから、フェージ由来のものであると考えられる。pH 9 での $\phi 80$ 野生株の溶菌液中に含まれるエキソヌクレアゼ活性を時間を追って測定し、約 2 時間まで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表した。反応に用いた溶菌液のフェージ濃度を 約 1×10^8 /ml で一定であると仮定した。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 $\phi 80$ 野生株とほぼ同程度のエキソヌクレアゼ活性を示したが、red B に属する変異株

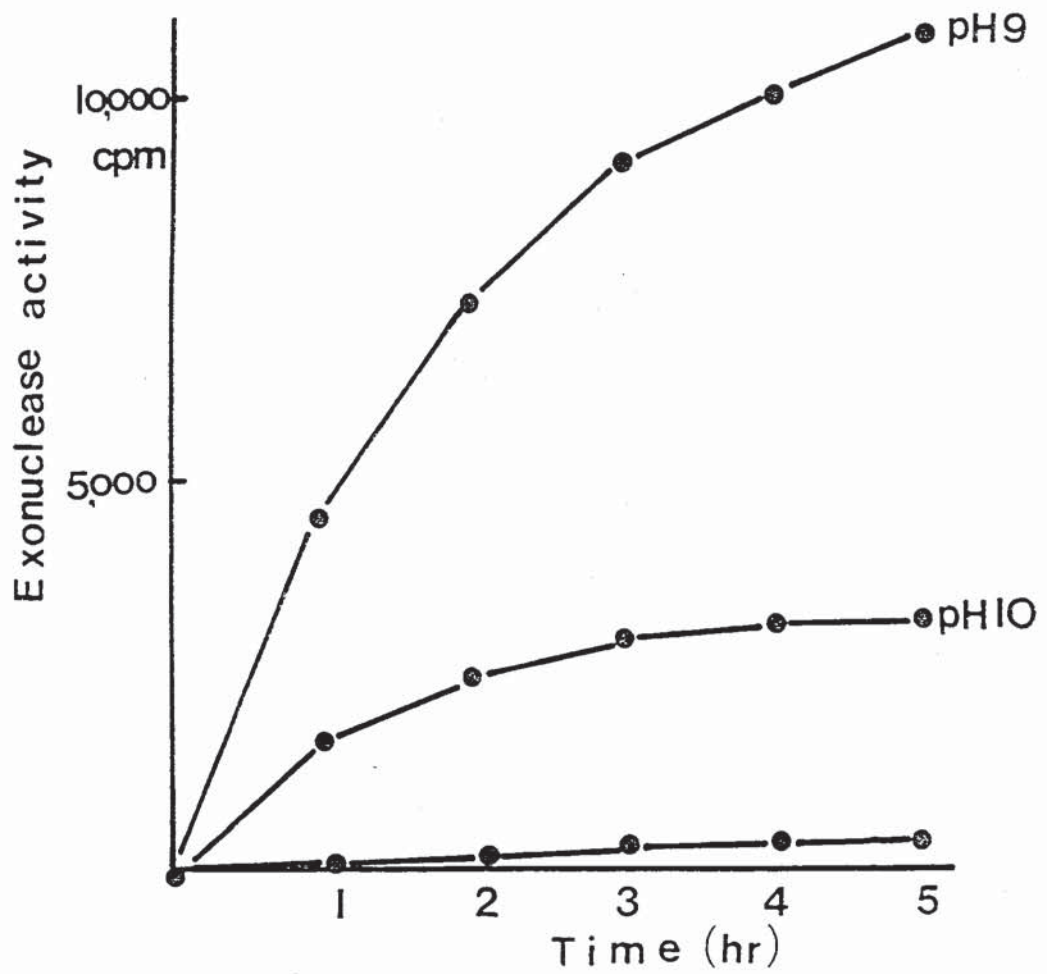


〔図 23〕 エキヌクレアーゼの至適 pH

pH 3~11 までのグリシン緩衝液を用い(両極端な pH では緩衝作用は少ない)。

エキヌ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] エキソヌクレアーゼ活性.

[図23]よりエキソヌクレアーゼの至適pHが9であることがわかった。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。

red22, red42 および 欠失変異株 $\Delta 8, \Delta 7, \Delta 6, \Delta 5, \Delta 4, \Delta 3$ などでは pH9 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 red B 遺伝子の機能を果していないことがわかった。従って red 遺伝子産物は タンパクバンド A, C, D とは対応せず、むしろ 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 δ 遺伝子に相当すると考えられる。分子量について、 λ のエキソヌクレアーゼが 25K, β タンパクが 30K であるのに対し、バンド E が 25K, バンド B が 40K という大きさからき 両者が対応しているのではないかと思われ。

6) P2 干渉 λ フェージの場合、red 遺伝子の左側に δ 遺伝子が知られている。大腸菌に P2 フェージが溶原化している場合、 λ 野生株はこの菌で増殖できない。これは P2 フェージの old 遺伝子による。しかし λ フェージ変異株 red⁻, δ ⁻ 株は P2 の干渉を受けず、溶原菌中でも増殖できる。φ80 から得られた欠失変異株はすべて red⁻ であり、とくに $\Delta 8, \Delta 4, \Delta 3$ などではその欠失の長さが電顕により、全体の約 14% に到達していることから red の左に隣接して、 δ 遺伝子に相当するものがある。それを欠失していると考えられる。従って φ80 に λ 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 フェージを大腸菌 C600S に溶原化させ、これに φ80 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] エキソヌークレアーゼ 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、ファージ感染による溶菌液 0.1 ml 中のエキソヌークレアーゼ活性を測定した。ラベルした大腸菌 DNA (594 cpm) 10 μl、グリシン緩衝液 (pH 9.0) 0.2 ml、大腸菌 tRNA 5 μl、に溶菌液 100 μl 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、上清に遊離した酵素活性を測定した。ファージ溶菌液は、L-ブロス中で 1.5×10^8 ml まで培養して C600S に m.o.i. 5 で各系-3 を吸着させ、 10^2 希釈後、L-ブロス中で 37°、150 分間振盪培養したものにクロロホルムを加えて調製した。どの溶菌液も約 10^8 ml のカビがあった。

のが表-10 である。表に示したように $\phi 80$ 野生株は P2 溶原菌で増殖でき、 $\phi 80$ 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⁻ 欠変異株についても当然、同じ結果であった。従って $\phi 80$ に δ 遺伝子に相当するものがあるかどうかは疑わしい。

(二) ハテロ二重鎖形成 得られた欠変異株の欠変マッピングを ハテロ二重鎖形成をさせて行なった。欠変の最も長いと考えられる $\Delta 8$ について行なった結果を 図 25 に示した。方法は〈材料と方法〉に示した。 $\Delta 8$ は $\phi 80$ 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 $\phi 80$ red⁻ 遺伝子がある領域を含み、前の結果と一致する。 $\Delta 4$ の欠失の位置は山岸らによ²⁴⁾ る既に決定されており、 $\Delta 8$ 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 $\Delta 5$ 、 $\Delta 6$ 、 $\Delta 7$ については実験進行中である。

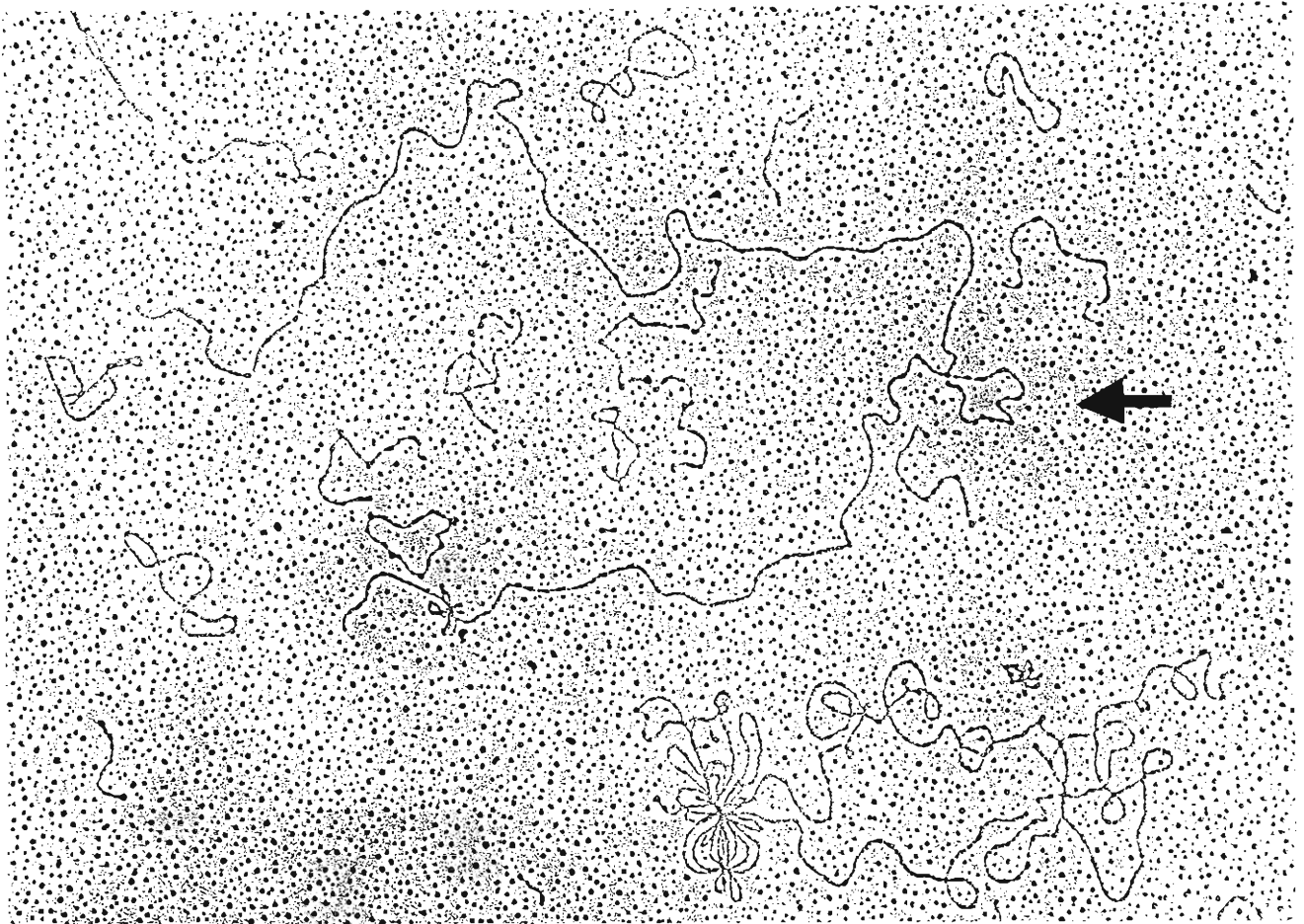
(ホ) フラック形態 得られた欠変株のフラックは 594, CA5013, C6005, Yred, BT63 以上で turbid であり、溶原化することができ。(図 26)

以上の結果を表 11 にまとめた。

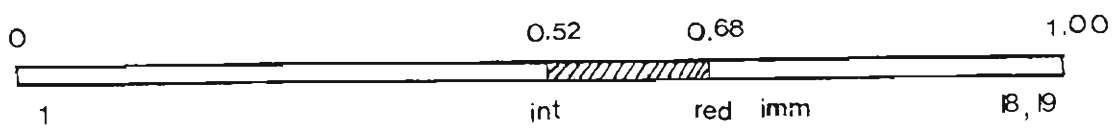
[表10] P2 干渉現象

	P2 Interference	
	C600S	C600S(P2)
φ80wild	1.0	1.0
φ80ptrp190h	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 フェージを C600S 菌に溶原化させ、さらに上記の φ80 フェージを感染させ、そのプレート効率を、C600S と比較した。C600S の場合を 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 フェージに対する immunity をもつこと、また、この菌が P2 フェージを生産ことから確かめられた。プレートとして T 入プレート、L-プレートを用いたがその結果は同じであった。



X 25,000



φ 80Δ8

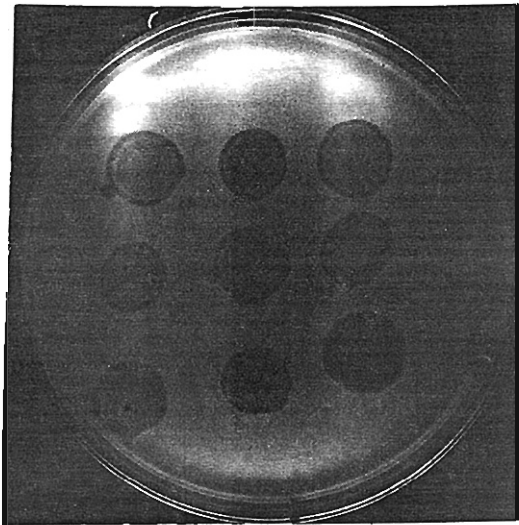
[図25]

最も欠失の大きいと思われる欠失変異株 φ80Δ8 の欠失マッピング

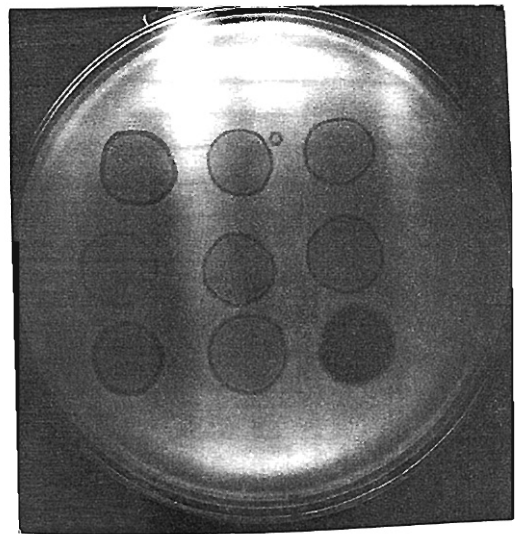
上図は φ80野生株と φ80Δ8 とのヘテロ二重鏡を電子顕微鏡

鏡で観察した写真である (倍率 25,000 倍)。下図はそれらの距

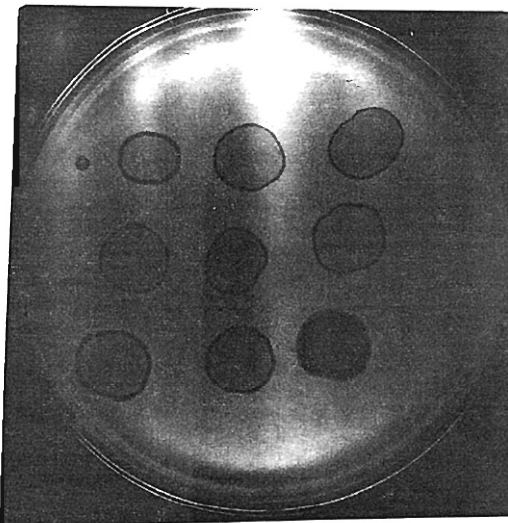
離を計算し求めた。矢印の部分か欠失のために行き来不能ループがある



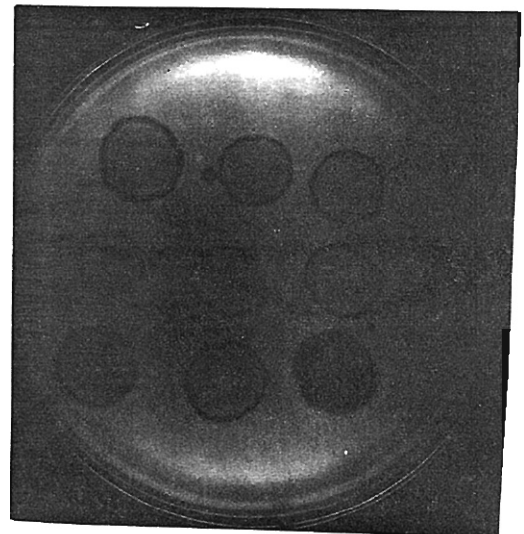
594



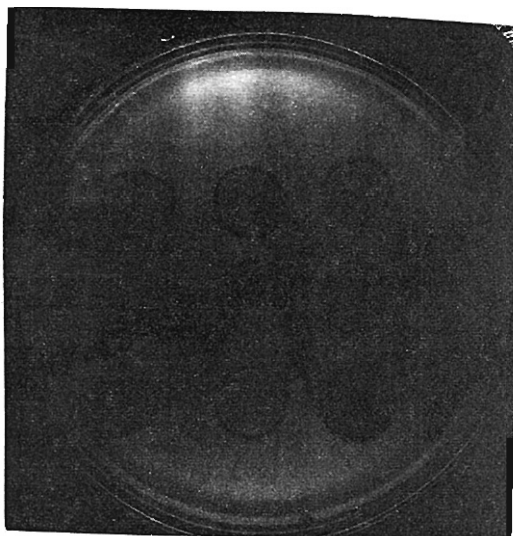
CA5013



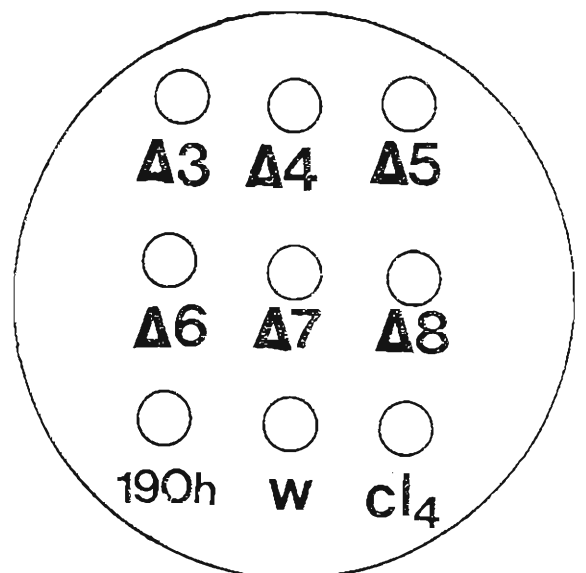
C600S



Ymel



BT63



[図26]の説明

欠失変異株のスポットの形態.

得らぬT= 欠失変異株のクリアクターロットから, 59.4 (Su^-), CA5013 (Su_1^+)

C6005 (Su_2^+), Ymel (Su_3^+), BT63 (Su_6^+) などを十λプレート上に

約 $10^8/ml$ のクリアクターをスポットし、一夜37°Cで培養後観察した。

Characters of deletion mutants

	E		B		A		C		D	
$\phi 80_{wild}$										
	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
	$\Delta 5$	$\Delta 6$	$\Delta 7$	$\Delta 8$	$\Delta 3$	$\Delta 4$	$\Delta 8$			
fec	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±
red	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
redA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
redB(exo)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
exonuclease	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2interference	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

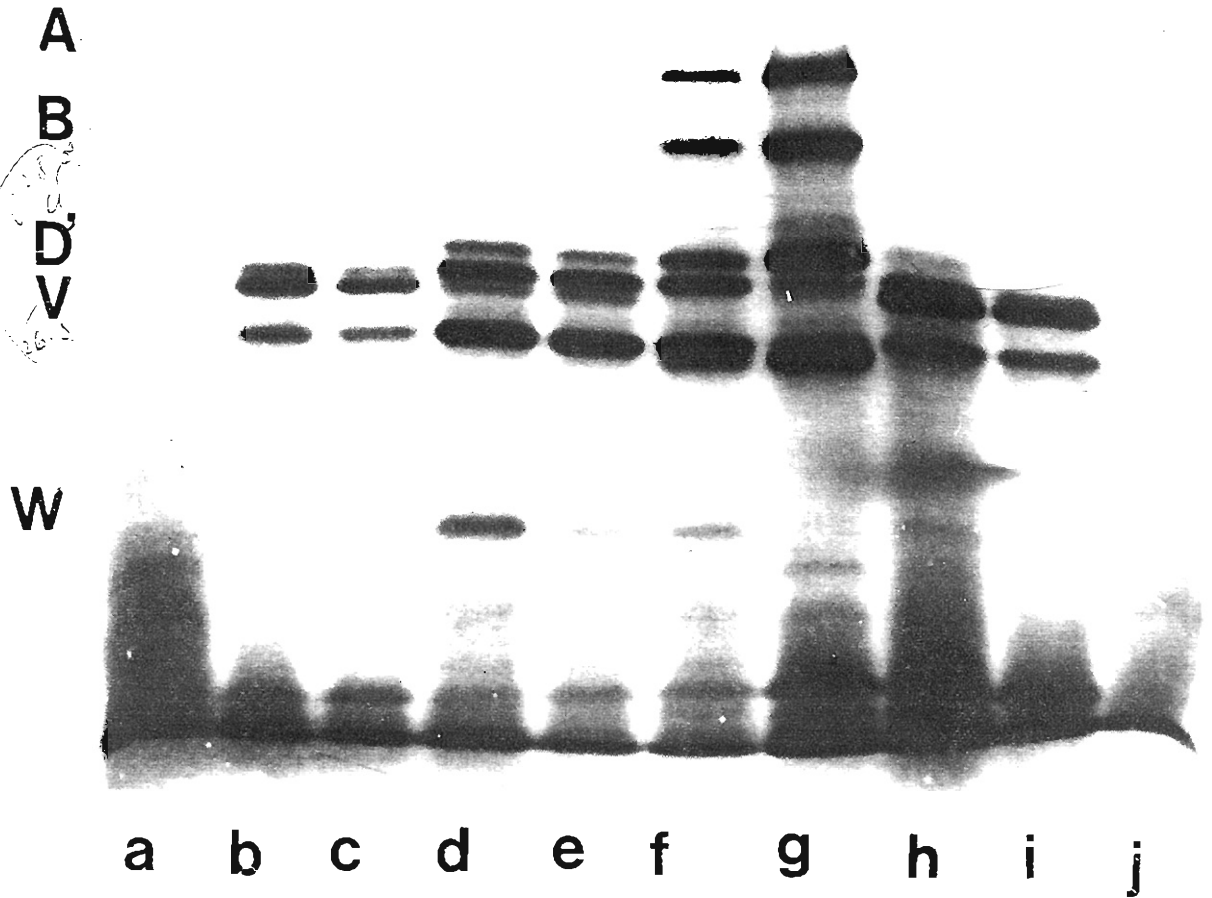
redA; complement with $\phi 80_{redA12}$, redB; complement with $\phi 80_{redB42}$,

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、それぞれ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、この両方の転写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、 $\phi 80\Delta 3 \times \phi 80\text{sus620}$ から得た組換え体、 $\phi 80\Delta 3 \text{ sus620}$ についても言える。図27は $\phi 80\Delta 3$ と $\phi 80\Delta 3 \text{ sus620}$ のそれぞれの UV照射菌におけるタンパクパターンを示したものである。Δ3の場合、検出できるバンドは U, V とバンド D のフラグメントと見られるバンド D' (28K) が見られ、W のバンドは非常に薄い。しかし $\phi 80\Delta 3 \text{ sus620}$ 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、その由来は不明である。このように Δ3 の場合にも sus620 変異が存在すれば、第一群(D') と第二群(U, V, 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 $\phi 80\Delta 3 \times cI_{\text{am7}}$ より得られた組換え体 $\phi 80\Delta 3 cI_{\text{am7}}$ では、このタンパクパターンは su⁻, su⁺ と Δ3 のそれと変わりなく、cI が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、

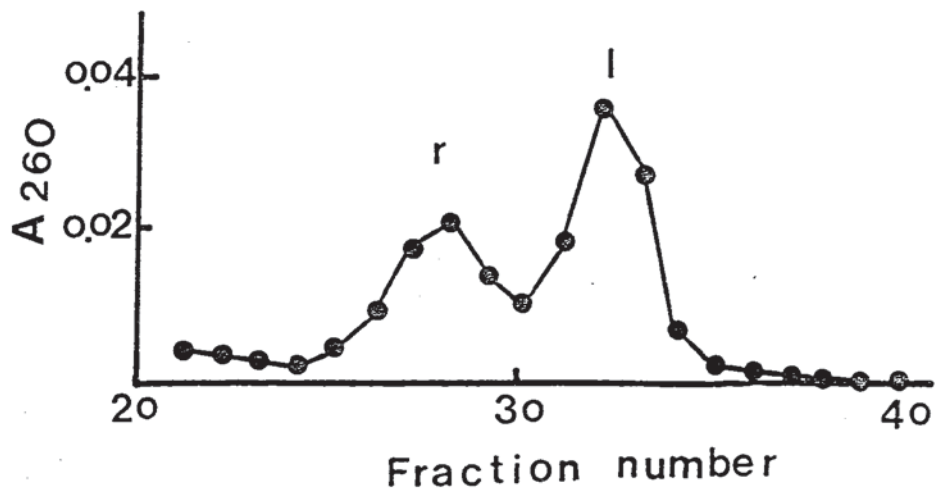


[図 27] $\Delta 3$ sus620 と $\Delta 3$ と $\Delta \Delta 3$ cIam7 の ϕ -1107 の ϕ -1107- \rightarrow

UV照射菌 NB-1(su⁻)、NB-1supF⁻(su₃⁺) に $\Delta 3$ の ϕ を得た: $\phi 80 \Delta 3$ sus620, $\phi 80 \Delta 3$ cIam7 を感染させ、その ϕ -1107 を分析した。(a) NB-1(su⁻) 宿主 ϕ -1107 (b) $\Delta 3$ は NB-1(su⁻) に、(c) $\Delta 3$ は NB-1supF⁻(su₃⁺) に、(d) $\Delta 3$ sus620 は NB-1(su⁻) に、(e) $\Delta 3$ sus620 は NB-1supF⁻(su₃⁺) に、(f) $\phi 80$ sus620 は NB-1(su⁻) に、(g) $\phi 80$ 野生株は NB-1supF⁻(su₃⁺) に感染させ得た ϕ の ϕ -1107- \rightarrow である。(h) は NB-1supF⁻(su₃⁺) の宿主 ϕ -1107 である。

この両カシロンの転写に関する遺伝子30の働きを調べる上で、このカシロンの転写方向を知ることは非常に重要である。そこでこのタンパク群の変化の顕著な二組、すなわち $\phi 80$ 野生株と $\phi 80$ sus620 変異株、および $\phi 80 \Delta 3$ と $\phi 80 \Delta 3$ sus620 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 OcS₇ DNA とハイブリッド形成可能な領域に転写がほとんど限られていることからハイブリッド形成の鑄型 DNA としては OcS₇ DNA に代えて $\phi 80$ DNA を用いた。さらに $\phi 80$ DNA を ℓ と r の一本鎖に分離し、15) それぞれにハイブリッドさせることによって転写の方向を調べた。 $\phi 80$ DNA は W. Szybalski の方法に従って分けた。図28 に示したようにポリUG は r 鎖により多く結合し、CsCl 密度勾配により重い分画に集まり、 ℓ 鎖と分離することからわかった。得られた ℓ , r 鎖を「材料と方法」に従って処理した後、ミリポアフィルターに 5 μ g / フィルターになるように吸着させ、ハイブリッド形成に用いた。

su⁻の大腸菌 594 に、「材料と方法」に従って、 $\phi 80$ 野生株、sus620 変異株、 $\phi 80 \Delta 3$ 、 $\phi 80 \Delta 3$ sus620 をそれぞれ感染させ、0分、5分、10分、15分、20分の各時刻に一分間 3H-ウリジンを mRNA をラベルした。RNA を抽出後、 $\phi 80$ DNA、 $\phi 80$ rDNA、 $\phi 80 \ell$ DNA のフィルターとハイブリッドを形成させ、フィルターに残った放射能活性を測定した。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] $\phi 80$ 野生株 DNA の粗補鎖分離.

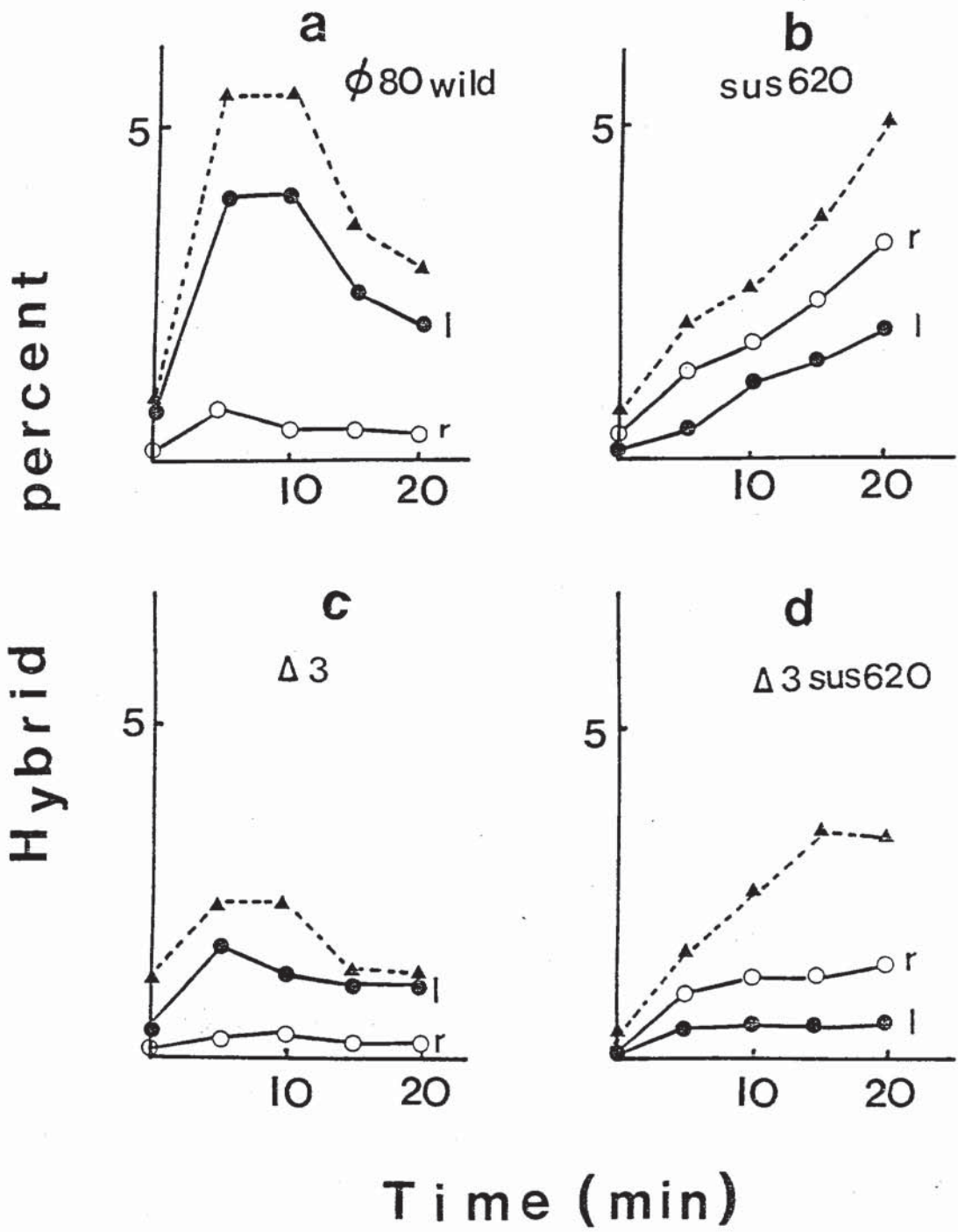
$\phi 80$ 野生株 DNA を poly UG を用いて、その粗補鎖に分離

した。左側が $CsCl$ 密度勾配遠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 付近が r が、

$\phi 80$ DNA の r -鎖で、分画番号 32 付近が l が l -鎖で

ある。



[図29の説明] $\phi 80$ 初期 mRNA の転写方向

[図30]で分離した $\phi 80$ r, l DNA 鎖を鑄型に用いて、初期 mRNA の転写方向を調べた。詳しい方法は〈材料と方法〉で述べている。

$\phi 80$ 野生株、 $\phi 80$ sus620、 $\phi 80 \Delta 3$ 、 $\phi 80 \Delta 3$ sus620 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) $\phi 80$ 野生株、(b) $\phi 80$ sus620、(c) $\phi 80 \Delta 3$ 、

(d) $\phi 80 \Delta 3$ sus620 をそれぞれ m.o.i. 5 で感染させ 20 分目まで

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

$\phi 80$ r DNA 鎖と、黒円は $\phi 80$ l DNA 鎖と 1 対 1 の比率で形成されたとき

の割合を示してある。

sus620は単調に合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全体の転写のうち鎖鎖とハイブリッド形成する左向き転写が圧倒的であるのに対して、φ80 sus620では、r鎖とハイブリッド形成する右向き転写が鎖鎖とハイブリッド形成する左向きの転写を上回っていることがわかった。同様の結果はφ80Δ3とφ80Δ3 sus620を比較した場合についても得られた。この結果から、二つのタンパク群をコードするオペロンは互いに逆方向に転写されていることが推論される。すなわち第一群のタンパク(A, B, C, D, D', D'', E)はφ80野生株で転写翻訳が強く、鎖鎖からの転写により、第二群(U, V, W)はsus620変異株でよく発現され、r鎖からの転写によると考えられる。

まとめと考察

φ80 *sus620* は、大腸菌 *su1⁺*, あまいは *su2⁺* でサフ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 *cI4sus8* と *sus620* の組換えの結果から、*cI* のすぐ左に (約 0.01 ~ 0.05%) にマッピングされることわかった。このように *cI4* の左にマッピング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。

3H-ウラジンによる RNA ハルストラベル実験より、*sus620* 変異株では、φ80 immunity 領域近傍の初期 mRNA 合成のみが行われ、野生株で見られるような中期、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分後の初期 mRNA 合成の低下もなかった。このうち前者の、*cI* の左にある複製に関与していると思われる中期 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 *cI* の左にある必須でない遺伝子の転写にも大きな変化を与えることが UV 照射菌を用いた タンパクパターンの分析からわかった。UV 照射菌はフージ由来のタンパクの検出に非常に有効な手段である。しかし φ80 野生株を感染させた場合、検出できたタンパクは *cI* から左の組換えに関与する必須でない遺伝子産物であり、*sus620* はじめ、その他の興味ある *sus* 変異株や *cI*、*cII* 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 φ80 では 93

(1) 左側のオペロンの転写、翻訳が強く、7P-ジ遺伝子の発現を調節し、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ためであると考えられる。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もあるかも知れない。

このように UV 照射菌で検出できたタンパクを同定する目的で、φ80 野生株から EDTA
処理により、欠変異株を単離したが、これらは図 21 に示したようにタンパクの欠
が順序立っており、ランダムな欠失を示さなかった。このことより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 (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が決定できないが、山口のデータや λ との対比から、おそらく、E, B
の順序であると思われる。欠変異株はまた、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、欠変異株 Δ5 は fec⁻, Δ6,
Δ7 は fec[±], Δ8 は fec⁻ であることから、λ の r に対応する遺伝子産物はバンド A
に相当すると考えられる。バンド A の右には、アオーバーコドンで連なっていると考えられる
バンド C とバンド D が存在する。φ80 野生株がすでにこのような変異をもっていたことが
タンパク分析で初めてわかった。このバンド C とバンド D に相当するタンパクはともに
必須でないため、この変異が知られなかったわけである。このような分子の役割につ
いては興味をもたれる。これらの欠変異株をとれる第一群のタンパクに対し、欠変異の

とれなかった第二群のタンパクがある。それらをコードする遺伝子の位置は確定してないが、バンドDとcI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欠失してないバンドやフラグメントが残ることを既述したが、このことは欠失と転写の方向が向い合っていることを示している。一方 fec⁻との対応や φ80ptp190hのタンパク質から、この第一群タンパク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 att から cI の方向へ伸びていると考えるのが妥当である。そうすると、Δ8, Δ4, Δ3 などの大きな欠失変異でも U, W, W など第二群に属するタンパクが残ることは、それらが、少なくともバンドDより右側(cI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、転写は右向きに起こるとすれば、先の att より cI 方向に伸びる欠失変異が Δ8, Δ4, Δ3 などと越え、第二群のタンパク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発現が停止すると思われる。そのためこの第二群オペロン上にも必須遺伝子(遺伝子30を含めて)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コードする変異株がとれなかったのは以上の理由によるのではないかと考えている。この第二群タンパクは sus620 変異によりその合成が増加する性質をもっている。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、この第二群のタンパクが右向きオペロンによりコードされている可能性が高い。また sus620 変異は第一群のタンパク

を減少させると、第一群の左向きαオペロンに主要影響を与える。これらのことを総合して、sus620変異は第一群、第二群のオペロンに対して、次のような作用を有すると考えられる。

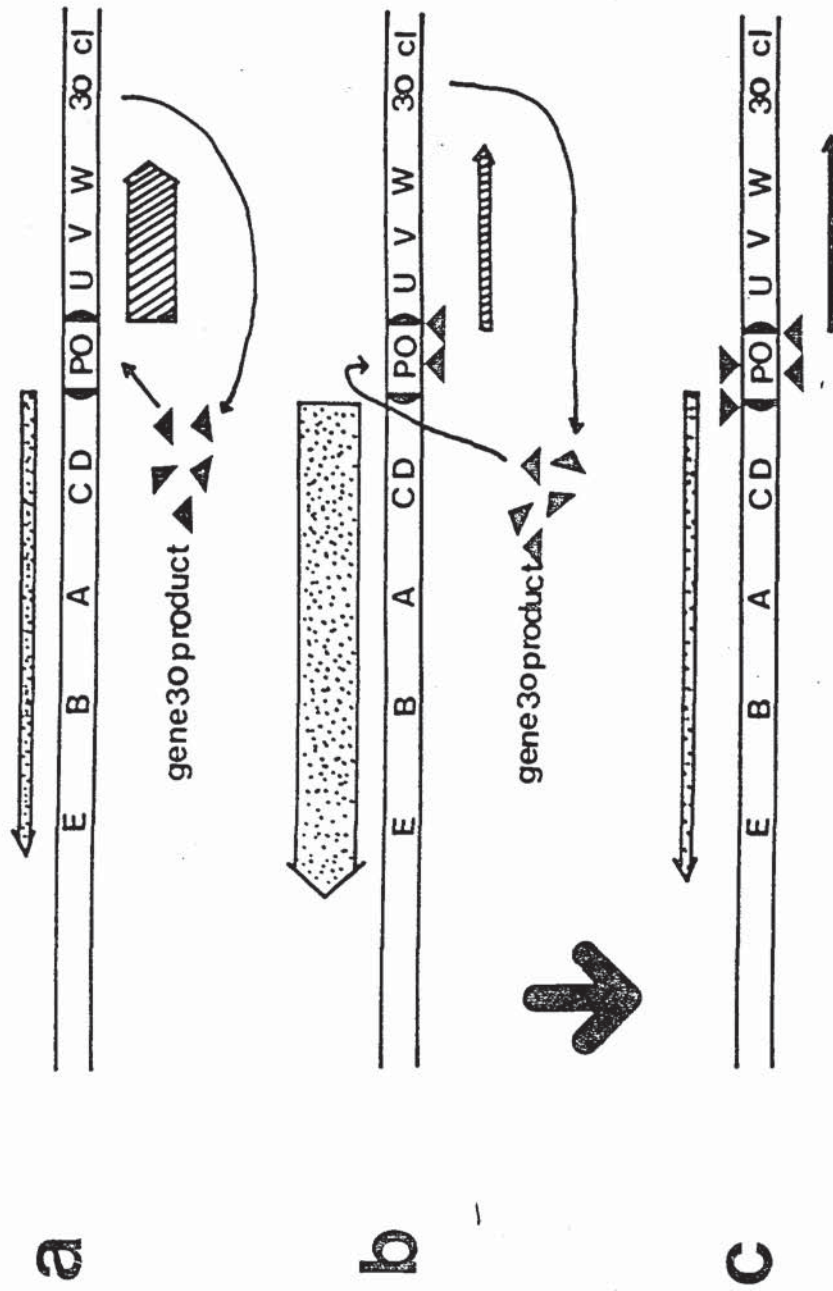
図30のように第一群のタンパクは左向き、第二群は右向きαオペロンにコードされていると仮定すると、調節タンパクのない状態(図30a)では右向きαプロモーターが強く働き、U、V、Wのタンパクが多く合成され、何らかの干渉作用によって、これと近接あるいは重複した左向きのプロモーターからの転写が阻害される。これがsus620変異のあるときの状態である。φ80野生株の場合には遺伝子30産物がこの右向きα転写をレプレサーのような形で抑制するため、左向きの転写が回復し、第一群タンパクの合成が増加する(図30b)。感染後時間がたつと、遺伝子30の産物が直接あるいは間接的に左向きの転写を抑制するようになり、初期の両オペロンの発現抑制(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を鋳型として転写を行なったが、それがin vivoを反映しているかどうか判断がむずかしい。しかしL0c57 DNAとハイブリットを形成する初期mRNAを1鎖と2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。しかしこの作用機作の証明には右向き転写とU、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している遺伝子の位置の確認。

転写のより正確な様式などを知らることが必要である。

このような作用をもつ転写調節遺伝子は λ ϕ 80 に特異的なものであると考えられる。さらにこの遺伝子は中期遺伝子転写にも必須であり、多くの役割を担っていることから、その作用機作に興味かたられる。

[30]

Transcriptional regulation by gene30 product



[図30]の説明, $\phi 80$ 遺伝子30の作用機構.

$\phi 80$ 初期の転写. とくに cI の左側について考察した.

(a) $\phi 80$ 初期転写は. cI の左にある隣接. または重複したプロモーター

から l, r 両方向に行なわれ. l 鎖側には. E, B, A, C, D など. スジ

紐換えに参与していると思われる遺伝子群があり. r 鎖側には. 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. $\phi 80$ sus620 の sus

菌に感染した non-permissive 状態では. この図のように. l 鎖から行な

る転写が弱く. r 鎖で転写するプロモーターの方が強力である.

(b) $\phi 80$ 野生株の大腸菌 感染後 0-15分目までの転写. permissive 状

態で. 感染直後には. 遺伝子30産物がこの r 鎖側の転写を抑制

し. その結果. l 鎖の転写が増大する. この状態は感染後 15-20分目まで

続く.

(c) $\phi 80$ 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 鎖側の転写も抑制するようになり. 初期 mRNA 転写が低下

して抑えられる.

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. Szybalski. *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. Groschedl, R., and Hobom, G. *Nature* 277, 621-626 (1979)
8. Gelfand, D.H., and Hayashi, M. *J. Mol. Biol.* 44, 501-516 (1969).
9. Szybalski, 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. *Method 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. *Biken J.* 4, 133-135 (1961)
18. Seto, 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. Miozzari, 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

本研究と遂行するにあたり、終始 熱心な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下さいました今本文男助教授はじめ、松代研教室員の皆様に、感謝いたします。

本研究にアがることのできない貴重な菌株、ファージなどをいただいた阪大 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、井口二郎博士、京大 理学部 山岸秀夫博士、京大 ライス研 今井六雄博士、京大 化研 岡 穆宏博士、九大 薬学部 堀内忠郎博士、阪大 微研 山口剛博士に深く感謝いたします。