



Title	アクチノマイシンSによる細菌RNA合成阻害に関する研究
Author(s)	山田, 毅
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28869
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	山 田 毅 やま だ たけし
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 7 5 3 号
学位授与の日付	昭 和 40 年 6 月 15 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 生 理 系 学位規則第5条第1項該当者
学 位 論 文 題 目	アクチノマイシン S による細菌 RNA 合成阻害に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 川 俣 順 一 (副査) 教 授 堀 三 津 夫 教 授 米 田 正 彦

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

アクチノマイシン (ACT) が DNA と特異的に結合しその結果 RNA 合成阻害, 続いて蛋白合成阻害の生ずることは 1959 年川俣等の報告以来多数の研究者によって認められており, 現在この抗生物質は医学, 生物学の領域において遺伝情報の伝達, 蛋白合成制御等の機作研究に重要な物質として注目されるにいたっている。しかし, ACT による DNA 依存性 RNA 合成に対する阻害様式に関してはまだ不明な点が多い。本研究の目的は, 細胞内に存在する各種 RNA 合成に対する ACT の阻害態度を解析し, DNA 依存性 RNA 合成の機作, ひいては蛋白合成の制御機作を解明する手がかりを得ることにある。

〔方 法〕

- (1) 使用菌。阪大微研保存の *B. subtilis* SB15 株の ACT 感受性および耐性株を用いた。
- (2) 培養。ブイヨン培地を用い, 水平振盪培養 (37°C) を行なった。
- (3) アクチノマイシン。アクチノマイシン S を用いた。
- (4) 同位元素による核酸の標識。 ^{14}C -ウラシル (4.8mc/m. mol) を 0.02 μC /O.D. 660 になるようにおのおの菌の培養に加えた。
- (5) 核酸の抽出。ドデシル硫酸ソーダ (SDS) 存在下におけるフェノール抽出法によった。すなわち菌体を遠心集菌洗滌後これに 3 倍量のトリス緩衝液を加え, リゾチームにより溶菌せしめた後, DNase を加え, 0.25% SDS 存在下で等量のフェノールで 20 分間振盪後, 遠心し水層に 3 倍量のエタノールを加え, -20°C, 30 分静置後生じた沈澱を緩衝液に溶解し, さらに DNase で処理した後, 除たんばくをくり返す。エタノールにより生じた沈澱を 70% エタノールで 1 回洗滌後, トリス緩衝液に溶解せしめた。

- (6) RNAの分画。蔗糖密度勾配法によった。すなわち5-20%の蔗糖 10^{-4} M の Mg^{2+} を含む pH 5.0 のトリス緩衝液の直線的密度勾配を作り、試料をのせ 39,000 r.p.m. 270分間、水平ローターで遠心後、底から滴下せしめて画分を採取した。
- (7) 測定。分画した核酸の存在は $260\text{ m}\mu$ における吸光度の測定および、ガスフローカウンタ (Nuclear Chicago) による放射能 (c.p.m.) の測定により示した。

〔成績〕

- (1) *B. subtilis* SB 15株の培養に際しACTを種々の濃度に加え6-7時間後RNAを抽出し、蔗糖密度勾配法で展開した結果、ACT濃度の増加に従い、23S, 16S RNAの順にその合成が、阻害され、沈降定数の小さいS-RNAに相当する画分の相対的増加が認められた。
- (2) 上記の菌株の培養を ^{14}C -ウラシルで3分間標識し、その後(1)と同様に展開すると16Sと4S RNAとの間にいくつかのピークを示す放射活性を持つものが、認められた。 ^{14}C -ウラシルで3分間標識後、培養を急冷、洗滌し ^{14}C -ウラシルを含まぬ新しい培地で再び、 37°C に培養を続けた後、同様の処理をすると放射活性は、23S, 16Sおよび4S-RNAに一致して証明された。故にこのような条件下で合成されたRNAはメッセンジャーRNA (m-RNA) と思われる。その際、低濃度のACTが存在すると16Sに近いものが減少し4Sに近いものは余り減少しなかった。
- (3) *B. subtilis* SB 15株の $10\mu\text{g/ml}$ ACT 耐性株を、ACT $3\mu\text{g/ml}$ 存在下に培養し、7-8時間後、 ^{14}C -ウラシルで3分間標識し、菌体を集め(2)と同様に処理した。この際も (m-RNA) への標識のとりこみは(2)と同様、16Sに近いものがおさえられ4S RNA 附近へのとりこみには影響が認められなかった。また、この条件のもとでは、 $260\text{ m}\mu$ の吸収で測定した 23S RNAがACTを作用せしめない対照に比べると、ほとんど消失し、わずかに肩を示す程度であった。すなわち23S 附近のリボゾームRNAの減少が認められた。

〔総括〕

B. subtilis SB. 15株がRNAを合成するにあたり、沈降定数の大きなRNAが、小さいものより、ACTによってより強く阻害を受けるという、現象を報告した。すなわち、リボゾームRNAがS-RNAのごとく沈降定数の小さいものより強くその影響を受け、リボゾームRNAでも23Sのものが16Sのものより強く阻害を受けるということである。このような現象はパルス標識によるm-RNAと考えられるものにおいても同様であった。以上の結果は最近私が報告したジフテリア菌のRNA合成系における同様の事実とあいまって、分子量の大きいRNAがACTでより阻害され易い機構の存在することを示唆するものであり、ひいてはDNA依存性RNA合成の機作を解明する手がかりの一つになるものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

〔目的〕

アクチノマイシンはDNAと特異的に結合する結果、細胞内におけるDNA依存性RNA合成を阻

害するが、その際、細胞の種々のRNAに対する阻害態度を研究することにより、現在なお不明な点の多いRNA合成機序、ひいては蛋白合成の制御機序を、よりいっそう明らかにしようとしたものである。

〔方法〕

B. subtilis SB 15株を振盪培養し、その対数増殖期において ^{14}C -ウラシルを3分間、あるいは30分間、菌体にとりこませ、その後SDS-フェノール法でRNAを抽出し、これを5~20%のしょ糖密度勾配遠心により分離し、各分画のもつ260 $\text{m}\mu$ における吸光度を測定すると共に、 ^{14}C -ウラシルに基づく放射能をも測定した。そして、このとりこみに対するアクチノマイシンSの阻害態度を検討した。また、培養の初期から阻害濃度以下の微量のアクチノマイシンSを加え、一定時間後にRNAを抽出し、上と同様に分画、260 $\text{m}\mu$ の吸光度により、RNAの測定を行なって、対照のそれと比較検討した。以上の実験をアクチノマイシンS耐性株を用いても行なった。

〔結果〕

1) アクチノマイシンSは、*B. subtilis* SB 15株のメッセンジャーRNAの合成を、アクチノマイシンSの濃度の高い場合はそのすべてを、濃度の低い場合は23S 附近の沈降定数の大きいものが減少し、4S 附近のものは減少せず、むしろ相対的な増加が認められた。

2) リボゾームRNAも23S、16S RNAの順に阻害せられ、4S RNAに相当する分画の相対的増加が認められた。

3) アクチノマイシンS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性株を用いることにより、感受性株と同様の傾向をよりいっそう明瞭に示すことができた。

4) RNA合成に対するアクチノマイシンSの阻害態度のこのような差は、シストロンの大小に基づく、アクチノマイシンSによる“hit”の機会の多少によるものと推論した。

5) アクチノマイシンS存在下に増殖した菌のRNAには、23S RNAの著しい減少が認められた。菌が、このような大きい沈降定数をもつRNAの不足ないしは欠乏状態でも増殖可能であるということは、細菌の生理を考える上からも興味ある現象といえる。

以上の実験成績ならびにそれに対する考察は、細菌のRNA合成に対するアクチノマイシンSの阻害態度を詳細に研究した結果得られたものであって、アクチノマイシンの作用機序の研究のみならず、細菌のRNA合成機序や生理解明にいくつかの重要な知見を加えたものである。