The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【7】

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 753 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 0.02μc/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）存在下におけるフエ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存在下で等量のフエノールで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，除たんぱくをくり返す。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。庶糖密度勾配法によった。すなわち５－20％の庶糖 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 mμ における吸光度の測定および，ガスフローカウンター (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，庶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。故にこの様な条件で合成された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 10μg/ml ACT 耐性株を，ＡＣＴ 3μg/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，260mμ 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－フエノール法で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 mμ 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，260mμ 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 10μg/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。