枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の 不完全溶原ファージ

吉 川 寛*

I 序

自然界に存在する溶菌 (bacteriolytic) または殺菌 (bacteriocidal) 作用を示す粒子はバクテリオファージとバクテリオシンに大別することができる。バクテリオファージには細菌に感染するとその遺伝子 (DNA または RNA) を注入、自己増殖し溶菌させる感染性 (virulent) を示すものと感染力を持つと同時に一定の頻度で遺伝子が細菌の遺伝子の中に組み込まれるか、あるいは細胞質内に安定な形で留まって細菌の増殖と同調的に増殖し溶菌を起こさない性質 (temperate) を持つファージに分類される。temperate ファージが細菌の DNA 中に組み込まれている状態を溶原性またはそのような状態の細菌を溶原菌 (lysogen) とよぶのはこのような菌を紫外線照射やマイトマイシン C (MC) のような DNA 合成阻害剤で処理するとファージの自己増殖が誘発され溶菌が起こるからである。

バクテリオシンは細菌が細胞外に生産する物質で同種または類縁の菌に殺菌作用を示す。初めはいわゆる抗生物質の一つと考えられたが高分子蛋白質であること、作用範囲が限定されていること、作用機構がファージの殺菌作用に類似し抗生物質の作用と異なること、等からバクテリオシンと総称されている。この中には低分子でトリプシン可溶性・耐熱性で電子顕微鏡で不可視なものとトリプシン不溶、熱に弱く電子顕微鏡下でファージまたはファージ構成粒子¹⁾状の物質が観察されるものに分けることができる。

一見全く異なって見えるファージとバクテリオシンは次のような多くの共通点を持っている。(1) バクテリオシンの生成を支配する遺伝子の多くは細胞質内に存在するが temperate ファージのある種のもの (

E. coli の P_1) や溶原菌に重複感染したファージ DNA も同様である。(2) バクテリオシンの生成は溶原性ファージの自己増殖を誘発する方法と同じ処理で誘発される。(3) バクテリオシンはファージと同様に細胞表面の特異的な受容体と結合する。ある種のバクテリオシンはファージと共通の受容体を持つ場合がある。(4) 紫外線照射により遺伝子の注入、増殖能を失ったいわゆる“ファージゴースト”はバクテリオシンと類似の殺菌作用を示す。(5) 高分子バクテリオシンのあるものは形態的にファージの尾や頭と区別できないような粒子状である。(6) バクテリオシン生成因子を持つ細菌は同種のバクテリオシンの殺菌作用を受けない。これは溶原菌が同じファージに感染されない (immunity) ことと同じである。

このような類似点からバクテリオシンとファージ粒子は生物学的に同じ起源を持つ近縁のものであると考えられ進化的なつながりが種々推論されている。

ファージおよびバクテリオシン粒子に加えて1960年代に種々の細菌の溶菌液中から形態的にファージ粒子と全く同様の粒子が発見された²⁻⁹⁾。これらは同種の菌を殺す作用を示すが感染性は全くない点でファージと異なり、また殺菌作用は示すが粒子中に遺伝因子である DNA を含んでいる点でバクテリオシンとも異なり、両者の中間に位置して進化的にバクテリオシンとファージをつなぐものと考えられることができる。このようなファージ様粒子は感染力がないことと溶原性ファージと同様の方法で生成が誘発されることから不完全溶原ファージ (defective prophage) または殺菌粒子 (killer particle) とよばれている。このような不完全ファージは多くの細菌から発見されており広く自然界に分布するものと考えられる。それにもかかわらず詳細な研究が行なわれたものは極めて少なくよく知られているものは大腸菌の一種の *E. coli* 15 の coliphage 15

A defective bacteriophage PBSH in *Bacillus subtilis*:

* Hiroshi YOSHIKAWA 金沢大学がん研究所生物物理
(Cancer Research Institute, Kanazawa Univ.)

と枯草菌の一種 *B. subtilis* 168 株のファージ PBSX, π および μ くらいであろう。またこれまでの研究の多くは電子顕微鏡による粒子の形態の同定および粒子に含まれる DNA の物理化学的測定が主なもので粒子の生成機構に関する研究は少なくまたバクテリオシンで詳細に行なわれているような作用機作に関する研究は皆無である。

著者らは枯草菌 *B. subtilis* 168 株をマイトマイシン C 処理したとき生産される不完全ファージ粒子についてその生成機構と粒子中に含まれる DNA 分子の物理化学的および遺伝的構造を詳細に研究した。その結果この粒子は完全ファージとバクテリオシンの中間的存在として位置づけられるばかりでなく、溶原性ファージの誘発現象とは異なる全く新しい機構により誘発生成されることを見出した。このような不完全ファージの研究は細胞内に存在する溶原性因子または細胞質内の独立遺伝子の形質発現および自己増殖と細胞自身の DNA 合成との相関関係を理解する上に極めて重要な材料であると考えられる。このような観点から著者らの研究を紹介しながら問題点を明らかにしたいと思う。

なお *B. subtilis* 168 株の不完全ファージ粒子はすでに Marmur らに発見され、その生成機構は Okamoto らにより報告されているが著者らが PBSH について得られた結果と部分的にはよく一致している。したがって PBSH は Marmur らの PBSX と同一かあるいは極めて類似した不完全ファージ様粒子であると考えられる。

II 不完全ファージ粒子 PBSH の誘発

PBSH 粒子の生産は溶原性ファージの生産と同様に紫外線照射やチミン要求菌をチミン欠乏状態で培養するとき誘発されるがマイトマイシン C (MC) 処理により最も効果的に生産される。図 1 に *B. subtilis* 168 の種々の変異株と W 23 株を $4 \mu\text{g/ml}$ の MC 処理による溶菌状態を示した。突然変異株の中ではチミン要求菌が最も MC 感受性であり W 23 はこの濃度の MC では溶菌されない。この 23 株は 168 株の近縁の株であるが、いかなる方法でも PBSH を生産しない。後に述べるように W 23 は PBSH の殺菌作用を受けるから PBSH 遺伝子を持っていない株であると考えられる。

MC 感受性菌 168LTT を用いても MC による溶菌すなわち PBSH の生産を起こす条件は極めて限られており生育速度の速い非合成培地で対数期の初期、細胞数が、 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 以下の状態のみで有効に生産され

図 1. マイトマイシン処理による溶菌 *B. Subtilis* の 4 種類の株を Penassay 培地で 1.5×10^7 まで生育し、 $4 \mu\text{g/ml}$ マイトマイシン C (MC) を加え 15°C で振盪後、汚過、洗浄、同量の MC のない新鮮な培地中で振盪を続ける。新しい培地に移したときを 0 時とする。濁度は Klett 比色計により測定した。(文献番号 10 より引用)。

る。細胞濃度が増加したり生育速度が遅い合成培地では PBSH の生産は 10~5% 以下かまたは全く起こらない。

これはこの不完全ファージの生産に最も特徴的なことであり、溶原性ファージの誘発現象と異なり細菌の DNA 合成速度に完全に依存している。チミン欠乏状態、uv 照射、5-プロモウラシル処理等による誘発は効率が悪く MC の場合の 5~10% 以下である。

溶菌液を $80,000 \text{ g}$ 、60 分の遠心分離で濃縮したものを電子顕微鏡で観察すると図 2 のようである。長い繊維状の flagella の他に数多くの構造体が観察される。完全なファージ様粒子 (P)、ファージ尾様粒子 (T)、およびファージ頭様粒子 (HH) が存在する。頭様粒子のあるものは flagella に結合しているようにみえる (H)。

濃縮した溶菌液を比重 1.30 g/cc の CsCl 中で平衡沈降させるといくつかの帯状に分離される。各々の画分を電子顕微鏡で観察し同定することができる。この方法で図 2 で観察された完全ファージ粒子は均一な比重 (1.375) のファージ粒子として精製される (図 3 A)。また図 2 の尾と頭は比重 $1.29 \sim 1.32$ に濃縮されるが形態的にみて完全ファージ粒子の尾と頭の部分と全く同一である (図 3 B)。このことは尾と頭のアミノ酸組成の分析によっても裏付けられている。

これらのことから *B. subtilis* 168LTT は MC 処理

図 2. 粗濃縮溶菌液の電子顕微鏡図 (negative staining)
1% アンモニウムアセテート溶液を約同量燐タンゲステンカリ (1.8%, pH 6.7) と混ぜフォームバググリッドに滴下。1~2分後濾紙で過剰の液体を除去。直ちに観察する。(方法の詳細は文献番号10を参照。)

図 3. A) 精製ファージ PBSh 粒子の電子顕微鏡図。(2と同様の negative staining) B) 精製ファージ PBSh の尾と空の頭部の電子顕微鏡図 (図2と同様の negative staining) (文献番号10より引用。)

によって一種類のファージ様粒子を産生するが同時に不完全な尾および頭部の粒子をファージとほぼ同量細胞内に蓄積していることが明らかである。これらの不完全粒子は完全粒子が取り扱い中に破かいされたものかどうか決定的な証拠はないが後述する生成機構から考えて過剰に生産され完成されていない粒子であると考えられる。

Ⅲ ファージ PBSh 粒子とその DNA の性質

A) 物理化学的性質 CsCl 中の PBSh 粒子の比重は 1.375g/ml であり粒子中の DNA の比重は 1.705g/ml である。これらからファージの DNA 含量は重量比で16.5%と計算される。表 1 に示す粒子の大きさからファージ粒子の容積は $81 \times 10^{-18} \text{cm}^3$ であり、比重 1.375 から計算すると粒子の分子量は $67.5 \times 10^6 \text{ dalton}$ 。したがって DNA の分子量は $11.1 \times 10^6 \text{ dalton}$ と期待される。これは実測値 $12.35 \times 10^6 \text{ dalton}$ と比較적으로一致する (表 3 参照)。

表 1. PBSh 粒子の大きさ

Determination	Size nm
Head (diameter)	41
Tail	17×200
Sheath contracted	20×120
Tail fibers	3×70
Tail core	7×200

精製したファージ粒子の尾のアミノ酸組成は表 2 に示す通りで精製 *flagella* の蛋白のアミノ酸と極めて類似の組成を示すことが分かる。このことはファージ蛋白の起原を考える上に興味深い事実である。

ファージ粒子からフェノール法で抽出精製された DNA は表 3 に示すような物理化学的性質を持っている。分子量は 0.2M NaCl 中の沈降速度と CsCl 中の zonal 沈降によって求められたが、いずれの場合も極

表 2. PBSH Tail と Flagella の
蛋白質のアミノ酸組成

Amino acids	No. of residues in a 10,000 M. W. protein (relative abundance)	
	PBSH tail protein	purified flagella
Lysine	7	7
Histidine	1	1
Arginine	3	2
Cystine	0-1	1
Aspartic acid	13	30
Threonine	8-9	5
Serine	6-7	6
Glutamic acid	11	9
Proline	3	2
Glycine	9	6
Alanine	9	8
Valine	8	4
Isoleucine	4	4
Leucine	7	6
Tyrosine	2	2
Phenylalanine	4	3
Methionine	1	2
Tryptophan	1	0-1

表 3. PBSH および PBSH DNA の物理的諸性質

Determination	PBSH	PBSH DNA	Denatured DNA
$S_{20,w}$	248	25.4	36.0
Molecular weight	68×10^6	12.4×10^6	4.97×10^6
(CsCl)	1,375	1,705	1,720
(Cs ₂ SO ₄)		1,424	
T_m		86.0	
GC %		43	

めて明瞭な境界を示し分子の均一性を示している。変性 DNA も同様に均一な分布を示し分子量は約 $1/2$ である。したがってこの DNA 分子は一重鎖切断のない二重鎖 DNA である。電子顕微鏡による観察では円形構造は認められなかった(図 4 参照)。

これまでに発見されたファージは Thomas によってその DNA の大きさおよび形態的に分類されているが分子量 10×10^6 dalton 前後のファージは発見されて¹⁴⁾おらず PBSH および *Bacillus licheniformis* の同様の不完全ファージ粒子がその空間を埋めるものとして注目値する。

最近 Marmur らは PBSH DNA の末端塩基を分析し²⁷⁾5'-末端は dG と dT であることを報告している。

図 4. PBSH DNA の電子顕微鏡図

A) フェノール法で抽出した DNA を $0.5 \mu\text{g/ml}$ DNA 0.01% cytochrome C. 混合物として 0.1M アンモニウムアセテート上に拡散、グリット上にとり、ウラニウムの rotary shadowing による。(文献番号10より引用)。

B) PBSH を 4M 尿素で分解して得られた DNA. 繊維の両端にファージ粒子の破片がみられる。(方法引用文献共Aと同じ。)

B) 生物活性 PBSH 粒子は調べられた限り種々の *B. subtilis* に対し感染力なく plaque を形成しない。PBSH 粒子を生成しない株 W23 には吸着し殺菌作用を示すが、PBSH 生産菌には作用しない。このことは溶原菌が同種ファージに対して示す耐性、またはバクテリオシン生産菌が同種バクテリオシンに対する耐性と同じ現象の免疫性 (immunity) によるものと考えられていたが PBSX 生産菌は PBSX 粒子を全く吸着しないことがわかっており、免疫性以前に生産菌は PBSX を吸着する受容体を欠くか変異した耐性

菌であると考えの方が適当であろう。

"killer particle" としての PBSH の性質はまだ全く研究されておらずその作用機作はバクテリオシン、ファージゴーストの作用との比較において興味深い課題であると思われる。

野性型の菌から得た PBSH 粒子を PBSH 産生株である *B. subtilis* 168 の種々の栄養要求菌と適当な条件下で混ぜると菌の多くの遺伝形質を野性型に転換することができる。この現象は当初不完全ファージ粒子による形質導入 (transduction) であると考えられたが、後にファージ粒子が細菌表面に全く吸着しないことから考えると真の形質導入ではなく、粒子中の DNA が一担粒子から分離したのち細胞の中にとりこまれる形質転換反応によるものと考えられる。これは反応が菌の "competence" の状態に完全に依存すること、また DNA ase により阻止されることによっても裏付けられている。

PBSH DNA によって形質転換が起こることは PBSH DNA に細菌の DNA が含まれていることを示している。temperate ファージは λ のように菌の特殊な遺伝子をファージ DNA 中に取り込むもの (Specialized transducer) と菌の遺伝子を受容性に取り込むもの (generalized transducer) が知られている。

E. coli のファージ P₁ あるいは *B. subtilis* のファージ PBS1 は後者のファージに属するがこれらは感染性のファージ粒子と非感染性で形質導入性を示すファージに分離することができる。^{15) 16)}

PBSH は多くの形質を転換することができるから generalized transducer に相当する。そこで PBSH 粒子の中で PBSH 遺伝子を持つファージ粒子と他の菌体 DNA を持つ粒子を CsCl 中の比重の差で分離することを試みたが粒子全体についてもまた DNA についても比重は極めて均一であり異なる成分に分けることは成功しなかった。ただ PBSH 粒子の場合は感染性を示さないためもし PBSH 粒子中極く少量が PBSH 遺伝子を含む真のファージ粒子であっても検出は極めて困難である。

さて PBSH はこのように菌体 DNA を無差別にとり込んでいるが形質転換の頻度は形質により異なり特に菌体染色体の複製起点に近い遺伝子である adenine-16 のみが異常に高頻度に含まれることが明らかになった。このことは PBSH 生成機構および菌体 DNA 合成との関係を解明する上に重要な事実であるので項を改めて説明したい。

IV PBSH 粒子の生成機構。

A) 枯草菌の DNA とその複製機構。PBSH 粒子の生成機構を説明する前にそれと密接な関連のある菌体の DNA とその複製機構について簡単に述べたい。枯草菌は通常 2 個の核を持っており各々の核当りの DNA 量は $5 \times 10^{-9} \mu\text{g}$ である。いいかえればもし染色体が一分子の DNA からできているとするとその分子量は 3×10^9 dalton である。オートラジオグラムによる研究では少なくとも $\frac{1}{2}$ 以上の大きさの分子が検出されており、¹⁷⁾ 生化学的または遺伝的にも DNA の円形構造を支持する結果が報告されているから枯草菌の染色体は一個の連続した DNA 分子であると考えてよいと思われる。¹⁸⁾

この巨大 DNA 分子はつねに一定の点 (複製起点) から始まり一定の方向に順に複製されて一定の点 (複製終点) で終了する。このような複製方法を逐次的複製とよぶ。¹⁹⁾ 対数増殖期の細胞集団が逐次的複製を行なっていると遺伝子の染色体上の位置と集団全体の遺伝子の頻度の間に一定の関係が成立する。いま染色体の長さを 1 とし複製起点を 0, 終点を 1 とする。起点から x ($0 \leq x \leq 1$) の位置にある遺伝子 X の頻度は $G(X) = 2^{1-x}$ である。対数増殖期の菌集団から DNA を抽出し各々の遺伝子頻度を測定するとこの函数から各々の遺伝子の染色体上の位置が決定される。図 5 の枯草菌の染色体地図はこのような方法で作られたものである。複製の順から決定された配列にはその後の研究で PBS 1 による形質導入によって決定された配列とよく一致することが示されている。起点に最も近い遺伝子は adenine-16, 終点に近い遺伝子は methionine と isoleucine である。したがって対数増殖期には ade-16 と met の比はほぼ 2 に等しい。

図 5. *B. Subtilis* 168株の遺伝子地図

種々の遺伝形質の染色体上の位置は対数増殖期の遺伝子頻度を形質転換法により測定して求められた。(詳細は本文および文献19参照) $G_n(X)$ の値は MC 処理直前の細胞集団 ($n = 2.23$) の各遺伝子の頻度を $G_n(X) = 2^{n(1-X)}$ より算出した値である。(文献11より引用)

枯草菌は通常のグルコース、アミノ酸合成培地では染色体当り唯一の複製点で合成される。ところがさらに生育速度の速い非合成培地中では染色体当り複製点²⁰⁾が3個以上で複製が起こることが知られている。

このときの複製様式は図6に示すような多分岐複製である。多分岐複製の染色体中の染色体の遺伝子頻度は $G(X)_n = 2^{n(1-X)}$ で表わされる。²¹⁾ (ここで n は同一染色体で同時に起こっている複製サイクルの数を表わす) また起点と終点の遺伝子の比 (ade-16/met) は 2^n である。このことから逆に対数増殖期にある菌集団の DNA の ade-16/met を測定することによって複製中の染色体の枝分かれの数すなわち複製点の数を求めることが可能である。

図 6. 多分岐複製の分子モデル

A) 正常な複製中の分子モデルで複製点は1個、複製中の染色体は円形で起点で新しく合成された2本の鎖と親の2本の鎖の末端が結合している。

B) 多分岐複製の分子モデルで最初の複製点による合成サイクルが完成しない間に第2、第3および第4のサイクルの合成で開始されている。同一染色体上で同時に起こっている合成サイクルの数 (このモデルでは4個) が図5の $G_n = 2^{n(1-X)}$ の n に相当する。A B 共に実線は親の DNA 鎖、点線は新しく合成された DNA 鎖を表わす。(文献20より引用)

以上述べたように枯草菌は逐次的に DNA を複製し特定の起点と終点を持っている。さらに形質転換により容易に起点と終点の遺伝子頻度を測定することができる。これらのことは細胞の DNA 合成機構とその制御を解明する上に極めて有利な方法である。

B) PBSh DNA の遺伝子頻度。 前述のように PBSh DNA は菌体染色体上の多くの遺伝形質を含んでいるが、その頻度は図7に示すように ade-16 のみが異常に高頻度に含まれている。MC 処理直前の細胞集団の ade-16/met は 4.7 であった。この集団は対数増殖期にあったから $G(X) = 2^{n(1-X)}$ から $n = 2.23$ が求められる。すなわちこの条件では平均して染色体当り 2.23 サイクルの同時合成が起こっていることを示している。

$G(X) = 2^{2.23(1-X)}$ からすでに染色体上の位置が決定されている cysteine-14 以下6個の遺伝子の頻度を求めることができる。この計算値と実測された PBSh DNA の遺伝子頻度を比較すると図7に示すように ade-16 を除く他の遺伝子は理論値とよく一致している。このことから ade-16 をのぞく他の遺伝子は無差別に一定の割合でファージ粒子にとりこまれるものと考えられる。一方 ade-16 はファージ粒子中に MC 処理前の約 5~10 倍濃縮されており、この変化は MC 処理をしてから溶菌するまでの細胞内の DNA の存在状態の変化に求めなければならない。

図 7. PBSh DNA 中に含まれる遺伝子

精製 PBSh DNA 形質転換活性を種々の変異株で測定、形質 X と methionine の形質転換率の比を算出する。それらを孢子 DNA の対応する比で補正したものを縦軸に、各遺伝形質の染色体上の位置を横軸に plot した。遺伝子頻度の期待値は図6で計算されたものである。(文献11より引用)。

C) MC 処理細菌による DNA 合成 対数増殖期 の細菌集団を $4\mu\text{g/ml}$ の MC で15分、 37°C で処理し濾過洗浄して再び新鮮な培地中で振盪すると約90分増殖後溶菌し PBSh を放出する。この間種々の方法で細胞内の DNA 合成を追跡することができる。MC 処理後蛋白質および RNA の合成はほとんど正常に起

こるが細胞分裂はいちじるしく阻害され、細菌は長い filament 状になる。一方溶菌直前まで DNA 合成は継続し全量で150~200%増加する。ファージ粒子中の DNA の約30%は MC 処理以前の菌体 DNA から、残り70%は MC 処理後に合成される DNA がとりこまれる。また菌体 DNA 全体の約30~40%が PBSH 粒子中に回収されている。したがって *ade-16* の増加は処理後に合成される DNA によるものと思われる。この点を明らかにするには処理後の細菌内 DNA 合成を前述の遺伝子頻度を測定する方法で解析しなければならない。図 8, 9, にこのような実験の結果を示す。MC 添加後約80分溶菌は起こらないから60分までは菌体内 DNA を抽出することができる。85分の標品はすでに溶菌が起きているから主として PBSH DNA と考えてよい。抽出した DNA は精製し形質転換反応により種々遺伝形質の頻度を測定する。測定値は各々の遺伝子の形質転換率の差を補正しなければならないので同時に胞子 DNA による形質転換を測定しその遺伝子頻度で補正される。補正された値を MC 処理後の時間に対して plot としたのが図9である。図で明らかのように MC 処理後 *ade-16/met* のみが変化し他の遺伝形質の頻度は全く変化しない。またファージ粒子中の DNA の *ade-16/met* の値は細胞内 DNA の頻度変化の延長上に求められる値とよく一致する。このことから PBSH DNA の *ade-16* の選択的な増加はファージ粒子形成のときに突然起こるものではなく MC 処理後細胞内で徐々に変化した結果であると考えられる。

ade-16 の頻度を選択的に変化させる原因は種々の可能性がある。第一は MC の直接的作用によって遺伝形質の形質転換能が失活されることが知られているが何らかの理由で *ade-16* のみが失活されないと言う可能性である。MC の処理による形質転換能の減少は全体の50%以下であり、*ade-16* の増加は MC を除去した後徐々に起こることから考えるとこのような可能性は少ない。さらにこの可能性は次に述べる5-ブロモウラシル (5-Bu) を用いた実験で直接的に否定することができる。

ade-16 が MC 処理後新しく合成されたものかどうかを調べるには新しく合成された DNA を重い比重の元素で標識した DNA から分離することによって可能である。比重の重い元素としては、 N^{15} , H^3 , C^{13} 等が使われるが PBSH の生産のような場合は生育速度を早くする必要があり合成培地ではアミノ酸混合物の

図 8. MC 処理細菌による DNA 合成: 菌の growth, lysis と sampling.

168LTT を Penassay 培地で培養。O- で MC (4 μ g/ml) を添加、直ちに (O+) sampling を開始する。各 25ml. (文献11を引用)

図 9. MC 処理細菌による DNA 合成.

図 8 の各 sample から DNA を抽出、その形質転換能を測定。marker X/met の比を胞子 DNA の値で補正し、MC 処理時間に対し plot した。(文献11より引用)。

他に塩基類を添加しなければならないのでこのような同位元素は使用できない。そこでこの菌がチミン要求菌であることを利用して塩基添加合成培地で15分 MC 処理を行ない洗浄後 5-Bu を加え新しく合成される DNA のチミンを 5-Bu で置換することを試みた。

図10に示すように 5-Bu で置き換えると時間的には約30分遅れるが対照と同様に溶菌を起こし PBSH を

放出する。しかし合成培地では DNA 合成量は非合成培地の $\frac{1}{2}$ 以下でありさらに 5-Bu 存在下では対照の約 40%に低下する。これに対応して *ade-16/met* の値も減少し対照で処理前の 3 倍, Bu 存在下では 2 倍に増加するにすぎない。したがって *ade-16/met* の値が 5 倍以上になる非合成培地での合成様式を正しく反映しているとはいえないが, 少なくとも *ade-16* の増加が合成によるものか否かの判定は可能である。

図 10. 5-ブロモウラシル (5-Bu) 存在下の growth, lysis と DNA 合成。

168LTT をアミノ酸, 塩基添加合成培地で培養, 矢印で MC を添加15分インキュベート後, 1). チミン添加 (+T) 2). チミンの代りに 5-Bu 添加 (+5Bu) 3). チミン欠乏(-T). の新しい培地中でインキュベートを続ける. MC 添加前まで培地に ^3H -チミジンを加え, 濾過洗浄後の培地には ^{32}P を加え, 適時 DNA 合成を測定した. (文献11より引用).

5-Bu 存在下の溶菌液から PBSH を精製しその DNA を CsCl の濃度勾配, 平衡沈降により分析すると図11のような結果が得られる, すなわち, PBSH

DNA の70%以上は新しく合成された DNA でありその内50%は処理後に 2 回以上複製された DNA である. また *ade-16* は85%以上複製された内50%は 2 度以上複製されているのに反しその他の遺伝子は全て 1 度以上複製されることはなく特に leucine より終点に近い遺伝子の50%以上は未複製のままで残っている. すなわち MC 処理によって約50%の細胞はすでに起こっていた複製サイクルを完了できない程度に複製が阻害されているにもかかわらず複製起点附近のみは繰り返し複製が起こされていることを示している. このことから *ade-16* の増加は他の遺伝子の失活による相対的増加ではなく, MC 処理後の DNA 合成によって真に増加したものであることが明らかである。

図 11 5-Bu 存在下で生成された PBSH-DNA

図10と同じ条件で 5-Bu 存在下に生成された PBSH から DNA を抽出, 密度 1.70g/cc の CsCl 中で平衡沈降させる. 遠心管の底から分画し各分画につき, O. D.₂₆₀: $\bigcirc$ — $\bigcirc$, ^3H 活性: $\square$ — $\square$ (MC 処理前に標識された DNA), ^{32}P : $\times$ — $\times$ (処理後に合成された DNA) の活性が同鎖共完全に 5-Bu で置き換わった重い DNA (HH), 混成 DNA (HL) および元の軽い DNA (LL) に分布する様子を調べる. (図11A). また各分画の遺伝子活性を種々の形質について測定した, (*adenine-16* $\bullet$ — $\bullet$, *methionine* $\triangle$ — $\triangle$). 胞子 DNA で補正した *ade-16/met* および *leu/met* の比は LL ピークで 4.8, 1.8, LH ピークで 20, 2.7, HH ピークでは 35, と 3.0 である. (文献11より引用)

DNA 合成によって *ade-16* 遺伝子が選択的に増加する原因には、次の二つの可能性が考えられる。第一は PB_{SH} 遺伝子が *ade-16* の近くに位置しており、PB_{SH} 遺伝子の自己増殖に伴って *ade-16* 遺伝子も増加するという可能性である。この場合は PB_{SH} 遺伝子の合成と *ade-16* の複製が菌体 DNA の合成とは独立に起こることが観察されるはずである。第二の可能性は菌体 DNA の異常複製によるものである。MC 処理により複製の継続は阻害される(おそらく MC による二重鎖 DNA 間の結合による)が、蛋白質の合成は正常に進行するため新しい合成サイクルが次々 Initiate される。その結果起点付近で MC による連結が起こっていない部分のみが繰り返し複製されると期待される。この場合は第一の可能性と異なり合成される *ade-16* は菌体染色体の一部として合成されるはずである。

(DNA 合成の阻害による initiation の誘発については文献番号20を参照されたい)。

これら2つの可能性を区別するには合成される *ade-16* 遺伝子の細胞内での存在様式すなわち分子の大きさを測定すればよいであろう。このような実験の一例を図12に示す。菌をあらかじめ H³-チミジンで標識し MC で15分処理洗浄したのち ³²P を含む新鮮な培地で振盪を続ける。一定時間ごとに一定量の培地から全 DNA を抽出し蔗糖濃度勾配沈降法により MC 処理前の DNA (H³ラベル) と処理後に合成された DNA (³²Pラベル) の分子量を比較する。また遠心分離された各画分について *ade-16* の形質転換能を測定することにより、*ade-16* 遺伝子活性をもつ DNA の分子量を決定することができる。

この条件下では MC 添加後90分で溶菌は終了するか

図 12. MC 処理後細胞内で合成される DNA の分子量。

168 LTT を Penassay+³H-チミジンで培養、約10⁷/ml の濃度に達したとき MC 4μg/ml を加え15分処理、濾過洗浄して非放射性チミジンと ³²p を含む培地に移す。(多量の培養液を処理するため MC 添加から ³²p 添加まで35分が経過した)。さらにインキュベートを続け10分間隔で sampling し 80,000 g 60分の遠心で菌およびファージを集め DNA を抽出する。この二重に標識された DNA を 5-20%蔗糖液中で遠心分離し各画分につき、³²p 活性: ●—●, ³H 活性: ○—○, *ade-16*形質転換活性: を測定した。*ade-16*活性の——はそれに含まれる試料の平均値を示す(文献12より引用)。

ら95分目の標品はファージ PBSh DNA のみを含んでいる。図12に明らかなように PBSh DNA は26Sに狭い帯状に沈降するが菌体 DNA は30~50Sに不均一な幅広い分布を示す。この実験から明らかなことは第1に新しく合成される ^{32}P -DNA は元の菌体 H^3 -DNA と全く同一の分布を示すことであり PBSh DNA に相当する 26S DNA は75分まで全く現われない。第2に 26S DNA の出現と同時に H^3 -DNA と ^{32}P -DNA は同じ割合で 26S DNA に変化する。すなわち 26S DNA は直接合成されるものでなく、 ^{32}P 、 H^3 共に一度30S以上の大きさの菌体 DNA として合成されたのち 26S に転化するものと考えられる。第3に *ade-16* 活性はつねに菌体 DNA の高分子部分に存在し 26S には粒子形成直前にその一部分が移行するのみである。

これらの事実から *ade-16* の増加はファージ DNA の自己増殖によるものではなく菌体 DNA の合成によることが明らかであるばかりでなく、ファージ遺伝子の自己増殖は実験の精度内で確認できないほど、少量であるかまたは全く起こっていないことが証明された。

D) PBSh の誘発と生成機構 以上に述べたような実験結果を基にして、不完全溶原性ファージ PBSh 粒子の MC による誘発と細胞内の生成機構を考えてみたい。この粒子の生成に特徴的なことは通常の溶原性ファージの誘発現象と異なりファージ遺伝子の自己増殖が全く認められないことである。しかしながら一方ではファージ粒子を形成し溶菌に至るファージ遺伝子の発現が正常に起こっている。人工的な不完全溶原ファージは *E. coli* の λ について多くの形質の変異株を用いて研究されファージ DNA 合成と形質発現の関係が明らかにされている。その結果誘発の初期に合成される酵素は DNA 合成に無関係に発現されるが完全ファージ粒子の形成に必要な後期に発現される酵素の合成はファージ DNA 合成に依存することが報告されている。²⁴⁾ 同様のことは *coli* ファージ *T4* についても報告されている。²³⁾ またある種のバクテリオシンは MC でその生成が誘発されるが、MC 処理によって細胞内のバクテリオシン因子の数が増加していることが報告されている。このように細胞内に共有するファージ遺伝子やバクテリオシン因子の形質発現には遺伝子の複製が必然的に伴っているようである。しかし情報発現の制御と DNA 合成との関係はまだ分子機構として明らかにされていない。

さて PBSh の場合は前述のように PBSh 遺伝子の

自己増殖は認められない。したがって MC 処理による遺伝子の発現機構は完全溶原性ファージとは異なる機構が予想される。遺伝子の自己増殖無しに情報発現が起こる事実を説明する一つの方法は、情報発現が菌体 DNA の MC による異常な多分岐複製に依存することである。もし PBSh 遺伝子または PBSh の遺伝子の発現を制御する遺伝子が菌体染色体の複製起点附近に存在するとすると MC 処理によって起点附近のみの遺伝子が繰り返し複製されるから細胞内の遺伝子頻度が増加し結果的には自己増殖による DNA 増加と同様に抑制されている形質の発現が起こるのに十分の遺伝子量に達すると考えることができる。

この仮説を証明するためには PBSh の遺伝子またはその制御遺伝子の染色体上の位置付けが必須であるが PBSh は感染性を持たず変異株が得られ難いためまだ成功した報告がない。多分岐複製の結果として PBSh の産生が誘発されるとすると抑制された遺伝情報の発現機構の一つとして多分岐複製の重要性を考えなければならない。多分岐複製は MC 処理の他に紫外線照射チミン欠乏、5-Bu 処理、ナルディキシン酸処理等いずれも DNA 阻害剤で誘発される。

これらの処理はまた同時に溶原性ファージやバクテリオシン生成を誘発することはよく知られている。溶原性ファージ λ の誘発には紫外線や MC 処理によりまずファージ DNA の情報発現を抑制しているリプレッサーを失活させる作用を持つ物質が細胞内に生成されることが知られている。²⁵⁾ しかしこの化学的自体およびその生成機構は全くわかっていない。これらの研究に欠けているのは誘発後の菌体 DNA の合成が遺伝情報発現の制御におよぼす影響に関する研究である。枯草菌の MC 処理の場合のごとく *E. coli* の場合にも紫外線や MC 処理によって複製起点附近の多重複製が起こることが予想される。その結果として PBSh の生成のような特殊な遺伝情報の発現が起こり得ることは十分考えられることである。著者らは DNA 合成阻害剤により惹起される種々の現象の初期反応はこのような細菌 DNA の合成の異常化によって起こる情報発現による結果ではないかと考え枯草菌の複製起点附近の遺伝子構造の研究を進めている。

PBSh 生成機構で第二の興味ある点は菌体 DNA の粒子へのとり込みに関する問題である。巨大な菌体染色体がどのように一定の大きさの DNA 分子に分解されるのかは generalized transducer に一般的な問題である。DNA 分子の大きさは *T4* ファージのように

頭部粒子に包み込まれる DNA 量によって決定されるのかあるいは末端塩基の特異性と大きさの認識をかね備えた酵素が PBSH 生成中に合成されるのか今後の問題であろう。この場合にも PBSH は自己増殖を起こさないため有利な材料であると考えられる。

V PBSH DNA の *ade-16* 遺伝子

起点附近の遺伝子構造あるいは起点附近 DNA の化学的構造を研究する上にファージ PBSH の DNA は極めて有利な材料である。それは PBSH DNA が第一に起点附近の *ade-16* を含む DNA を他の部分に比し 5 倍以上選択的に濃縮していること、第二に細菌から抽出された DNA と異なり一定の大きさの均一な DNA 分子であるからである。もし *ade-16* を含む DNA が起点の DNA を同時に含んでいるとするとこの DNA 分子は物理化学的な諸性質で他の遺伝子を含む DNA 分子と異なっていることが期待される。

このような期待から遺伝子の比重、熱変性度、酵素による失活などの差を測定したが特に注目すべき差は認められずこれらの方法で *ade-16* を含む DNA 分子のみを単離する試みは成功しなかった。ところが一度熱またはアルカリで変性し一重鎖化した PBSH DNA を中性で 65°C に保温し元の二重鎖 DNA に再生する速度を各々の遺伝子について測定したところ、予想外に *ade-16* のみが他の遺伝子とは全く異なる挙動を示すことが明らかになった。PBSH DNA の熱変性と再生の典型的な実験結果は図13に示す。すべての遺伝子の形質転換活性は熱またはアルカリの作用でもとの約 2% に減少する。残存の活性は自然に作られた分子間結合のために変性されない DNA 分子によるものである。

(図17参照) これを 65°C で保温し形質転換能を経時的に測定すると *ade-16* 以外の形質はすべて methionine で代表されるような速度で再生する。反応は極めて遅く再生される活性は最大限、元の 20~25% に達するのみである。これに反し *ade-16* は非常に早くしかも効率よく時には 100% 以上再生する。見掛け上活性が 100% を超えているのは他の遺伝子が失活されるために *ade-16* の比活性が増加するため飽和量以上の DNA を用いたときのみに認められる。

adenine-16 のこの特殊な性質は PBSH DNA についてのみ認められるもので菌体から抽出した DNA では図14に示すように他の形質と同様の反応速度で約 20~25% 再生される。

菌体 DNA の再生反応の kinetics は図15に示すよ

図 13. 変性 PBSH DNA の再生。

PBSH DNA (18μg/ml) を SSC (0.15M NaCl, 0.01M Na₂·citrate) 中で 100°C 12分加熱、一部は直ちに氷水中で冷却し変性 DNA(D)とする。再生実験には加熱 DNA を 65°C でインキュベート適時 Sampling して急冷する。各々の sample につき *ade-16* および *met* に対する形質転換能を測定し 65°C における保温時間に対し plot した。(文献12より引用)。

うに初めの数時間二次反応で起こり次いで一次反応に移行する。これはすでに詳しく研究されているように再生反応は二つの反応段階…

…から成り立っていることを示している。すなわち第一段階の反応は一重鎖 DNA が互いに相補的な構造をもった DNA と熱運動によって遭遇し不安定な部分的結合を作る反応で“核化反応 (nucleation)”とよばれる。いうまでもなくこれは二次反応である。第二の反応は部分的に結合した二本の DNA 鎖が徐々に完全な水素結合を作る過程で普通“Zippering”とよばれており反応は一次反応である。

さて PBSH DNA の *ade-16* の再生反応の kinetics は図16に示すように反応の初めから終りまで一次反応である。このことは核化の反応が極めて早く起こり第二の Zippering が律速反応であることを示している。

核化反応が早くなる原因としてまず分子内の結合によって二重鎖の完全分離が起こらないことが考えられる。この可能性を調べるため PBSH DNA をアルカリ変性し、アルカリ性蔗糖濃度勾配中で沈降させる。

(図17) 各々の画分を変性したまま *ade-16* の形質転換能を測定すると活性はもとの約 2% であるが二つの peak に分かれる。重い方の peak は O. D. peak すなわち大部分の一重鎖 DNA の 1.4 倍の沈降恒数を持ち dimer に相当する部分である。これは自然に存在する分子内結合を持つ分子である。

図 14. 変性細菌 DNA の再生

宿主細菌 168LTT より抽出、精製した DNA を図13の実験と同条件で変性、再生を行ない、ade-16 および met の形質転換反応を経時的に調べた。(文献12より引用)。

図 15. 細菌 DNA の再生 kinetics

図14に示したデータを Kinetics の解析のため plot し直したもの。初期2次反応の速度 恒数 K_2 は ade-16 : $27 \times 10^{-4} \text{ ml}/\mu\text{g} \cdot \text{min}$ met : $29.8 \times 10^{-4} \text{ ml}/\mu\text{g} \cdot \text{min}$ である。 T_∞ : は図14の再生時間 9.5 時間の活性を。 T_t : は各々の時間の活性である。(文献12より引用)。

次に各画分を中和し65°Cで再生したのち ade-16 の形質転換活性を測定すると 活性の peak は一つで O. D. の peak と完全に一致する。この実験は ade-16 を含む DNA は約 2% の分子間結合を示す分子を除き大部分はアルカリで完全に変性される分子であることを

示しており、ade-16 遺伝子を含む DNA 分子が二重鎖の間に結合が存在する可能性は否定された。

第二の可能性として考えられるのは分子内に核化を促進するような構造が存在することである。そのような構造の一つとして簡単な塩基配列の繰り返された構造などが最も考え易い。このように ade-16 を含む DNA は他の DNA 分子とは異なる構造を持つことが再生の一次反応から推定することができるが、さらに ade-16 のみが100%再生される事実は ade-16 を含む DNA が全く均一な分子であることを示している。普通菌体 DNA を抽出すると DNA 分子は無差別に分解されるから分子の一部に同じ ade-16 遺伝子を含んでいても全体としては全く不均一な集団であるはずである。

このような不均一な分子を変性し再生すると完全なものの二重鎖 DNA にもどらず両端が部分的に一重 DNA であるような分子として再生されることが多い。このような分子の形質転換活性は完全二重鎖 DNA より低いため平均して20~30%の再生率しか得られない。したがって PBSh DNA の ade-16 が100%再生され

図 16. ファージ PBSh DNA の再生 kinetics

図13の ade-16 の再生を一次反応 kinetics に plot した。速度恒数は $K_1 = 3.7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ である。 T_∞ は図13の10時間再生後の活性を、 T_t は各時間に再生された活性を、 T_0 は変性 DNA の活性である。(文献12より引用)。

図 17. PBSH DNA のアルカリ性蔗糖液中の沈降。
35 μ g の PBSH DNA を 5-20% の 0.2N NaOH 蔗糖液中で 37,000 r. p. m. 45 時間沈降後分画。各画分の O. D.₂₆₀、アルカリ性のままの *ade-16* の形質転換能 (D)、および 65°C で 8 時間インキュベートし再生させたのちの活性 (R)、を測定した。(文献 12 より引用)。

る事実は *ade-16* 遺伝子を含む DNA は全く均一な分子であることを強く示唆している。著者らは PBSH の *ade-16* を含む DNA のこのような特殊性はこの分子が複製起点からファージ粒子によって一定の大きさに切断されてきた分子であるためであろうと考えている。

VI 総 括

PBSH 粒子は感染性がない “killer particle” であるということから不完全溶原性ファージとよばれているのであるが、生成機構を詳細に調べるとファージ遺伝子の自己増殖が全く起こっていないことがわかった。したがって PBSH は自己複製の能力を持たないという意味で不完全溶原性ファージということができる。最近多くの不完全ファージ粒子が発見されているが不完全さの内容は極めて多様であると思われる。たとえば Coli phage 15 は PBSH 粒子とは全く異なり宿主 DNA と比重の異なるファージに固有の DNA を粒子中に含んでいる。したがってこの場合ファージ固有の DNA 分子の自己増殖が当然起こっているものと考えられる。このようなファージの場合はおそらくファージ感染機構、たとえば DNA の細胞内への注入機構等に欠損が生じているものと思われる。

不完全ファージの起源については種々考えられるが大別すると次の 2 種類があるようである。第一は PB

SH で代表される型で generalized transducer と密接な関係があると思われるもの、第二は coli phage 15 のような通常の溶原性ファージと近縁のものである。普通不完全ファージを完全ファージとの比較で考えるとき、不完全ファージは完全ファージが退化して出来たものと考えられている。その考えに従うと PB

SH は P1 や PBS1 のような generalized transducer が自己増殖能を失い粒子の構成成分を合成する遺伝子と宿主 DNA を分解する能力を支配する遺伝子のみが菌体 DNA 中に組み込まれて残っているものであり、coli phage 15 は λ のような溶原性ファージが感染機構に欠損が生じたものである。

このような退化説は現存のファージを中心に置いた考え方である。バクテリオシンの起源についても古くから退化説と進化説があったが、現在ではかなり便宜的にファージ形態に近い構造体を持った高分子バクテリオシンはファージの退化物であり、低分子蛋白質を生産するものは F 因子のようなエビゾームの進化したものであると考えられている。

エビゾーム、バクテリオシン因子不完全ファージ、溶原性ファージ、感染性ファージ、は遺伝子的にも発現される形質の内容でも極めて近縁のものであり、これらの生物分子間の相互関係を正しく認識するにはそれらの内のどれかを中心に考えるのではなく物質進化の立場から全体を把握し位置づけなければならない。そのような試みの中からファージの起源や進化の問題が正しく理解されるように思う。最近の不完全ファージの発見とその研究は、バクテリオシンと完全ファージの間隙をうめてこの方向への研究を促進する重要な課題であると考えられる。

このような見地から PB

SH を考えたとき、重要なことは PB

SH 遺伝子の構造とその発現機構である。現在のところ遺伝子構造は全くわかっていないが個々の形質に対する遺伝因子が明らかにされれば遺伝子構造を確立し、これがファージレプリコンの退化であるかあるいは全く異った進化の過程にあるものか判断することができよう。また発現機構はすでに述べたように菌体 DNA の異常合成に依存している点でファージやエビゾームの形質発現と異なっており、この機構の詳細な理解はこの不完全ファージを進化的に正しく位置づけることを可能にするために重要な課題であると考えられる。

文 献

- 1) ファージおよびバクテリオシンの総説はD. E. Bradley: *Bacteriol. Review*, 31, 230 (1967) がすぐれている
- 2) D. E. Bradley: *J. Gen. Microbiol.*, 41, 233 (1965)
- 3) D. E. Bradley, C. A. Dewar: *J. Gen. Microbiol.*, 45, 399 (1966)
- 4) E. Hideya, A. Ayabe, K. Amako, K. Takeya: *Virology*, 25, 469 (1964)
- 5) E. W. Frampton, B. R. Brinkley: *J. Bacteriol.*, 90, 446 (1965)
- 6) A. S. Tikhonenko, I. A. Bespalova: Intern. Congr. Electron Microscopy 6th., Kyoto. p141, (1966)
- 7) D. J. Stickler, R. G. Tucker, D. Kay: *Virology*, 26, 142 (1965)
- 8) E. Seaman, E. Tarmy, J. Marmur: *Biochemistry*, 3, 607 (1964)
- 9) H. Ionesco, A. Ryter, P. Schaeffer: *Ann. Inst. Pasteur*, 107, 764 (1964)
- 10) M. Haas, H. Yoshikawa: *J. Virology*, 3, 233 (1969)
- 11) M. Haas, H. Yoshikawa: *J. Virology*, 3, 248 (1969)
- 12) M. Haas, H. Yoshikawa: *J. Virology*, 4, 844 (1969)
- 13) K. Okamoto, J. A. Mudd, J. Mangan, W. M. Huang, T. V. Subbiah, J. Marmur: *J. Mol. Biol.*, 34, 413 (1968)
- 14) W. M. Huang, J. Marmur: *J. Virology*, 5, 237 (1970)
- 15) H. Ikeda, I. Tomizawa: *J. Mol. Biol.*, 14, 85 (1965)
- 16) H. Yamagishi, I. Takahashi: *Virology*, 36, 639 (1968)
- 17) E. S. Dennis, R. G. Wake: *J. Mol. Biol.*, 14, 85 (1965)
- 18) H. Yoshikawa: *J. Mol. Biol.*, 47, 403 (1970)
- 19) H. Yoshikawa, N. Sueoka: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 49, 559 (1963)
- 20) H. Yoshikawa, M. Haas: *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 33, 843 (1968)
- 21) N. Sueoka, H. Yoshikawa: *Genetics*, 52, 747 (1965)
- 22) I. Mahler: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 73 (1966)
- 23) C. Levinthal, J. Hosoda, D. Shub: Molecular Biology of Viruses. J. S. Colter and W. Paranchych (ed) Academic Press Inc. New York.
- 24) A. Skalka, B. Butler, H. Echols: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 58, 576 (1967)
- 25) J. Tomizawa, T. Ogawa: *J. Mol. Biol.*, 23, 247 (1967)
- 26) K. W. Kohn, C. L. Spears, P. Doty: *J. Mol. Biol.*, 19, 266 (1966)
- 27) W. M. Huang, J. Marmur: *J. Mol. Biol.*, 47, 591 (1970)

新刊

機械は人間になりうるか!!

バイオニクス入門

—生物・機械・情報—

岩田倫典著 B6判 570円 70円

バイオニクスとは、生物システムにつき研究し、そのすぐれた機能を装置として実現する科学、技術の分野をいう。

生物、とりわけ人間は、それ自体現在の技術者ではつくりえないすぐれた機械でもあります。この点に注目し、これをお手本として生物の機能を“人類と調和をもたせた機械”として実現させようというのがバイオニクスという新しい学問です。本書はバイオニクスを生物と機械の話合いと考えて、この学問の考え方と、ロボット、人工臓器などの産物を絵入りでやさしく紹介したものです。

日科技連出版社

〒151 東京都渋谷区千駄ヶ谷1-7-14
電話(402)6511(代表) 振替東京 7309