の低下するのが認められた。(本論文の要旨は第5回日本ウイルス学会西日本支部総会に於て発表した。)

文 献

1) Enders, J. F., Weller, T. H., Robbins, F. C.: Science, **109**, 85, 1949. 2) 庄司淳一: 日本小児科学会雑誌, **60**, 864, 1956. 3) 庄司淳一: 日本小児科学会雑誌, **60**, 872, 1956. 4) 大山昭郎: ウイルス, **8**, 121, 1958. 5) 大山昭郎: ウイルス, **8**, 129, 1958. 6) 大山昭郎: ウイルス, **8**, 134, 1958. 7) 巽稔: 日本小児科学会雑誌, **69**, 581,

1956. 8) 愛媛県衛生部: 急性灰白髄炎発生報告, 1957. 9) Enders, J. F. et al.: J. Immuno., **69**, 673, 1952. 10) Scherer, W. F., Syverton, J. T., Gey, G. O.: J. Exper. Med., **97**, 695, 1954. 11) Syverton, J. T., Scherer, W. F.: Ellwood, P. M.,: J. Lab. & Clin. Med., **43**, 286, 1954. 12) Melnick, J. L. et al.: Amer. J. Hyg., **57**, 203, 1953. 13) 北岡正見: ウイルス, **2**, 48, 1952. 14) 甲野礼作: 公衆衛生, **6**, 128, 1949. 15) 北岡正見: 三浦悌二: 総合医学, **7**, 16) 佐々木健夫: 公衆衛生, **22**, 94, 1957.

フ ァ ー ジ 増 殖 の 生 化 学 的 研 究

第 2 報 フ ァ ー ジ 感 染 後 の RNA 合 成 に 関 す る 研 究*

木 方 行 郎**

YUKIO KIHO: BIOCHEMICAL STUDIES ON THE REPRODUCTION OF BACTERIOPHAGE.

(II) RIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS INDUCED BY BACTERIOPHAGE INFECTION.

[受稿 11月14日 1959]

T2 ファージの感染後に、感染細胞内で特異的なファージ DNA*** 及びファージ蛋白質が生成されるが、これらに先行して非ファージ蛋白質(抗ファージ血清で沈降せず、又ファージ蛋白質の前駆体でもない蛋白質)及び RNA の合成がおこることが知られている(1, 2)。我々は大腸菌のプリン要求株を用いての T2 ファージ増殖の研究から、感染初期の RNA 合成並びに蛋白質合成がファージの増殖過程の内で重要な意味をもつ初期反応の一つであると考えた(2, 3)。RNA 合成についてはその合成が量的にみて少いのでは議論があるが(4)、菌体 RNA とは異なつたヌクレオチド組成をもっているという点(5, 6)で新らしい RNA が合成されていると考えられるので、量的な問題だけでファージの増殖過程に於ける RNA の意義を無視することは妥当ではないと考えられる。

他方、一般の核酸並びに蛋白質の生合成のおこる際の RNA と蛋白質との同時合成という最近の立場からみると、ファージ感染後の RNA 合成と蛋白質合成とは量的に且又時間的にかなり不均衡な関連をもつて合成されているように見える。これらの問題について我々は先づファージ感染後に合成される RNA について更に詳細な検討を行った。その結果、ここで合成された RNA はかなりの速度で代謝回転をしており、更にこの RNA の動的な動きと蛋白質合成との間に密接な関連が存在していることがわかつたので、ここに報告する。

実験材料及び方法

1. ファージ: T2r⁺
2. 宿主菌: E. coli B (H).

* 本報の要旨は1957年第30回日本生化学会(木方),並びに国際酵素化学会議(渡辺, 木方)に於て発表した。

** 東京大学理工学研究所第四部

現在: 京都大学ウイルス研究所化学部

*** 以下次の略号を用いる。 DNA: デオキシリボ核酸 RNA: リボ核酸 TCA: トリクロール醋酸

3. 培地: トリスグルコース培地を用いた.

本培地の組成は次の如くである.

glucose	2g.
NaCl	5.4g.
KCl	3g.
NH ₄ Cl	1.1g.
CaCl ₂	0.1mM.
MgCl ₂	1mM.
tris-HCl buffer	0.1M.
P (as KH ₂ PO ₄)	20mg.
S (as Na ₂ SO ₄)	6mg.

per litre, pH 7.2

ファージの感染の操作としては、まずトリスグルコース培地で生育した対数期の *E. coli* B (H) ($2 \sim 3 \times 10^8$ colony former/ml) を予めトリス培地で洗滌した後、トリス培地で37°C, 30分間通気する。次で多重度5でファージを感染する。37°C 5分(ファージ吸着)後、冷却し遠心洗滌して未吸着のファージを除去した後、トリスグルコース培地に感染菌を懸濁させ37°Cでファージ増殖反応をスタートさせる。

ファージの調製、感染価の測定、菌数の測定等の操作は Adams の方法 (7) に従った。

4. 核酸及び蛋白質の定量: 夫々 P^{32} (orthophosphate) 及び S^{35} (Na₂SO₄) をトレーサーとして用いた。試料をまづ Schmidt-Thannhauser 法によつて分割した後、各分割の放射能をカウントして RNA 及び DNA 及び蛋白質の合成量をみた。結果は、核酸については $2.0 \times 10^{-11} \mu\text{g-P}$ (8) を、蛋白質については $2.4 \times 10^{-12} \mu\text{g-S}$ (9) を単位とし感染菌1ヶ当りの量で示した。

実 験

1. RNA の代謝回転

T2 ファージを感染させると同時に P^{32} を培地に添加した場合 Fig. 1. curve A に示したように、感染後直ちに RNA 合成がみられるが、これは約10分後に停止する。次にかかる RNA 合成が停止した後(11, 22分)で P^{32} を添加しても curve B, C に示したように、感染と同時に (0分) に P^{32} を添加した場合とはほぼ同じ状況で RNA 合成のおこることがわかる。このことから感染10分後の RNA 合成は一見停止するようにみえるが、かなりの速度で代謝回転をおこなっていることが考えられる。これは次の実験からもわかる。Fig. 2. に示したように、感染と同時に P^{32} を添

Fig. 1 P^{32} -incorporation into RNA and DNA in T2 infected *E. coli* B₂(H).

A: add P^{32} at $t=0$ min.

B: add P^{32} at $t=11$ min.

C: add P^{32} at $t=22$ min.

Fig. 2 P^{32} liberation from RNA in T2 infected *E. coli* B (H).

P^{32} was added at $t=0$ min. 7.5 min., 15 min., and 22.5 min. after P^{32} was added, its specific radioactivity was reduced by adding pH 7.0 phosphate buffer (P^{31}) to increase the orthophosphate concentration from 20 μg of P/ml to 2 mg of P/ml.

加して RNA 合成をおこさせた後、図中矢印で示した各時間に培地に過剰の無機磷酸（ラベルしていない）を添加し、培地の P^{32} の specific activity を 100 倍に稀釈して、既成の RNA- P^{32} のその後の態度をみると、かなりの速度で崩壊していることがわかった。

以上の実験から T2 ファージ感染後の RNA 合成は一見停止する如くにみえるが、それは合成と同時にほぼ同じ速度で崩壊が伴っておこっているからであると考えられる。

2. RNA 代謝回転と蛋白質合成

次に我々は上記のファージ感染後の RNA の代謝回転に及ぼすクロラムフェニコールの影響をしらべた。ここで用いたクロラムフェニコールの濃度は $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、これをファージ感染後 10 分で添加した。この条件下では蛋白質合成は S^{35} で追跡した場合、クロラムフェニコールによつて約 90~95% 阻害される。この際の RNA 合成並びに DNA 合成を夫々 Fig. 3. 及び Fig. 4. に示した。先づ RNA 合成はクロラムフェニコールの添加によつて curve C に示したようにクロラムフェニコールのない対照 (curve A) より増加する。更にクロラムフェニコールを添加すると同時に培地に過剰の無機磷酸を添加した場合は、curve D に示したように、既成の RNA- P^{32} は保存されて

Fig. 3 Effect of chloramphenicol on RNA synthesis in T2 infected E. coli B(H).

- A: control
 B: dilute P^{32} at 12 min.
 C: add chloramphenicol at 9 min. ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)
 D: add chloramphenicol and dilute P^{32} at 11 min.

Fig. 4 Effect of chloramphenicol on DNA synthesis in T2 infected E. coli B(H).

- A: control
 B: dilute P^{32} at 12 min.
 C: add chloramphenicol at 9 min. ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)
 D: add chloramphenicol and dilute P^{32} at 11 min.

いて、クロラムフェニコールを加えない時に無機磷酸添加によつてみられた崩壊 (curve B) はこの場合認められない。

以上の事実からクロラムフェニコールの添加によつて RNA の崩壊が止り、一方的な合成のみがおこっていることがわかる。

次に Fig. 4. からクロラムフェニコールの存在下でも DNA 合成はおこっていることがわかる。従つて RNA の崩壊と DNA の合成とは直接の関係はないものと考えられる。

以上の実験から RNA の代謝回転と蛋白質合成とが非常に密接な関連をもっていることがわかる。

考 察

T2ファージ感染後の RNA 合成は量的に云つて非常に少く、蛋白質合成と比較してみると両者の同時合成という最近の知見の例外の一つと考えられていた。然し本実験の結果から感染後の RNA 合成は、合成と同時に崩壊が伴つておこつており、必ずしも RNA と蛋白質との同時合成に対する例外ではないということがわかる。この点は最近 Volkin らが我々と独立に同じ事実のあることをみとめている (5)。増殖しつつある大腸菌の RNA は代謝回転を示さないという事実 (10) と併せ考えると、ファージ感染後の RNA は大腸菌の RNA とは異なつた代謝活性をもっており、両者のヌクレオチド組成の差異 (5, 6) と共にファージ感染後の RNA が新しい種類のものであるという証拠の一つを提供することになる。

ファージ感染後の RNA が何故かかる活潑な代謝回転を示すかという問題は将来に残されるが崩壊した RNA が DNA 合成に使われるという可能性は現在のところ考え難い。何故なら、上記の如くファージ感染後 10 分でクロランフェニコールを添加した場合、RNA の崩壊が止められるにも拘らず、DNA 合成は直線的におこっているからである。

クロランフェニコールによつて蛋白質の合成が阻害されている条件下で RNA の崩壊と蛋白質の合成とが密接な関連をもっていることがわかる。この場合、これら二つの現象の内、何れが指導的な役割を演じているかという問題が発生するが (註 1. 参照)、これはクロランフェニコールの作用機構の解明 (註 2. 参照) と、同時にファージ感染後の RNA 及び蛋白質合成がファージの増殖過程に於て如何なる意義をもっているかという点に関する解析と相俟つて解決されるべき将来の問題であろうと考える。

総 括

T2 ファージ感染後に合成される RNA は、活潑な代謝回転をおこしていることがわかつた。この事実は感染後の RNA が大腸菌の RNA とは異なっている新しい種類のものであるという一つの証拠を提供している。この場合、クロランフェニコールを添加すると蛋白質合成がほぼ完全に阻害される条件下で、RNA の崩壊が止り、その結果ファージ感染後の RNA は一方的な合成のみがおこっているということがわかつた。このことから RNA の崩壊と蛋白質合成とが密

接な関連をもっていることがわかつた。

註 1. この問題については新しい特異的な阻害剤をみつけることが目の急務であろう。スルファミン (スルファピリザンを使用した。) は先づ RNA 合成を止める試剤と考えられるが、(実際に増殖しつつある大腸菌の核酸並びに蛋白質合成に対するスルファピリザンの影響を後者の各種の濃度について検討すると、阻害は先づ RNA 合成にあらわれ、次で DNA 合成並びに蛋白質合成が阻害されてくる。) ファージ感染系で本試剤を用いた場合は、RNA 合成並びに崩壊、蛋白質合成は何れも同様に阻害され、三者間の区別をすることは出来なかつた。

註 2. 上記の如く、我々の実験条件下ではクロランフェニコールによる蛋白質合成の阻害は完全ではなくて、クロランフェニコールを添加しない対照の約 5~10% の蛋白質合成は常に残る。この場合の蛋白質の定量法は S^{35} をトレーサーとして用い、蛋白質分割 (冷 TCA 不溶分割: 5% TCA による沈澱部分を 2~3 回 5% TCA で洗滌し、更にアルコール処理をした。) に転入した S^{35} をカウントするという方法に従っているが、クロランフェニコールの存在下で生成した少量の蛋白質の S^{35} は 5% の 90°C 、TCA で処理すると、クロランフェニコールを添加しない場合に生成した蛋白質の S^{35} と異なつて、殆どすべての S^{35} は熱 TCA 溶性、即ち核酸分割に来ることがわかつた。これはファージの感染の如何に拘らず、大腸菌の蛋白質合成系でみられた。この事実は、クロランフェニコールの存在下で生成している S^{35} -蛋白質の、蛋白質合成過程に於ける位置に関して甚だ興味深い事実であると考えているが、今後更に検討を加えた上で報告する予定である。

本研究に当り、御指導と御討論を頂いた東京大学理工学研究所、渡辺格教授並びに渡辺研究室の諸兄姉に厚く感謝する。

文 献

- 1) Watanabe, I., Formation of non-phage-antigenic protein in *E. coli* infected with T2 phage. *Biochim. Biophys. Acta.* **25**, 665, 1957.
- 2) Watanabe, I., and Kiho, Y., Protein and ribonucleic acid synthesis induced by bacteriophage infection. *Proc. Internat. Symp. Enz. Chem., Tokyo and Kyoto.* **418**, 1957.
- 3) 木方行郎, ファージ増殖の生化学的研究, 第 1 報プリン要求株を用いてのファージ感染の初期反応の研究. ウイルス
- 4) Hershey, A. D., *Chemistry and viral growth. Currents in Biochem. Reserch.* **1**, 1956.
- 5)

Volkin, E., and Astrachan, L., Phosphorus incorporation in *Escherichia coli* ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. *Virology* 2, 149, 1956., Intracellular distribution of labeled RNA after phage infection of *E. coli*. *Virology* 2, 433, 1956. 6) Watanabe, I., Kiho, Y., and Miura, K., Effect of chloramphenicol on ribonucleic acid metabolism in *E. coli* infected with T2 phage. *Nature* 131, 1127, 1958. 7) Adams, M. H., Methods of Study of bacterial viruses. *Methods of Medical Research* (I.

H. Comroe, editor), Chicago, The Year Book Publishers, 2, 1, 1950. 8) Hershey, A. D., Dixon, J., and Chase, M., Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T2. I. Purine and pyrimidine composition. *J. Gen. Physiol.* 36, 777, 1952. 9) Hershey, A. D., and Chase, M., Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36, 39, 1952. 10) Hershey, A. D., Conservation of nucleic acids during bacterial growth. *J. Gen. Physiol.* 33, 14, 1954.

ポリオウイルスの不顕性感染に関する研究

第一報 不顕性感染の実態に関する長期観察*

窪 田 英 夫**

HIDEO KUBOTA: STUDIES ON THE INAPPARENT INFECTIONS OF POLIOVIRUS

1. *Longitudinal* observation of the inapparent infections in the field.

〔原稿受付 11月15日 1959〕

I. 結 言

ポリオウイルス感染者のうちで、麻痺型の定型的発症を示すものは、単にその一部にすぎず、大部分は不全型乃至不顕性感染の型をとることは既に認められている通りである。したがってポリオウイルス感染の疫学的実態をつかむには、不顕性感染の実情を把握しなければならない。

1949年 Enders³⁾等によつて組織培養法がポリオウイルスの実験室的研究に導入されて以来、ポリオウイルスに関する研究は長足の進歩をきたし、吾が国においても本法を用いて、ポリオ感染症の疫学的研究の開拓が進められ、健康者の抗体分布⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾や、健康者からのウイルス分離⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾が行はれ、ポリオウイルスの不顕性感染は、吾が国でも極めて普遍的な現象であることが明らかとなつた。しかしながらこれらの研究

はいわばある時間的経過における一断面の研究であつて、同一集団について計画的長期にわたり、不顕性感染の実態である健康児の感染率、感染の年齢、月別の感染状況、感染と発症との関聯等については、未だ組織的な研究がなく、外国においてもわずかに Fox¹⁾ Hammon²⁾等の研究をあげうる程度である。著者は東京都内の荒川、品川の2地区及び限られた集団ではあるが、2乳児院の健康児をウイルス学的、免疫学的に継続的に観察し、いささか吾が国ポリオウイルス感染の様相を掴み得たので、こゝにその成績を報告したいと思う。

II. 実験材料及び実験方法

1) 検体の採取：都内荒川及び品川の保健所管内の健康乳幼児(2ヵ月~2才3ヵ月)を各々約20名選び、昭和32年5月から10月に至る6ヵ月間、同一乳幼児か

* 本研究は文部省科学試験研究費の援助をうけた。

* 本研究の要旨は第32回伝染病学会総会及び第122回日本小児科学会東京地方会講話会において発表した。

** 東京大学医学部小児科学教室(指導:高津忠夫教授)
当時国立公衆衛生院衛生微生物学部(指導:甲野礼作博士)