逆に T_3 の濃度あるいは純度を測定することができる。但しこの値は光の散乱の補正をしていない。 T_3 の溶液はおおよそ 10^{12} /ml 程度以上であると薄紫色の乳光を示す。

総 括

1. 大腸菌を生育せしめて若いうちに集菌し新しい培地に濃く懸濁させてから T_3 ファージを感染させることにより、 $3 \sim 5 \times 10^{11}$ /ml の溶菌液を得ることができた。

2. 溶菌液から硫酸アンモニウム又は減圧蒸溜によつて、 T_3 を濃縮することが可能である。

3. DEAEセルロース・カラム・クロマトグラフィーによつて極めて純度の高い T_3 をよい回収率で得ることができた。 P^{32} 標識の実験から、 T_3 ファージの磷含量は 6×10^{-12} γ P/plaque forming unit と計算され、また 10^{11} /ml あたりの $260m\mu$ の吸光度は 0.18 で

あつた。

4. 塩濃度の低いところや、pH 6 以下では T_3 はかなり不安定である。

本研究にあたり御指導をうけた渡辺格教授に感謝する。この研究の費用の一部は文部省科学研究費によつた。

文 献

- 1) Adams, H. M., Bacteriophages, 1958, Interscience.
- 2) Anderson, T. F., 1949, Boton. Rev. **15**, 464.
- 3) Astrachan, L. and E. Volkin, 1958, Biochim. Biophys. Acta **29**, 536.
- 4) Fraser, D., 1951, J. Bact. **61**, 115.
- 5) Labaw, L. W., 1951, J. Bact. **62**, 169.
- 6) 西山桂子, 岡本利雄, 高浪満, 渡辺格, 1960 日本化学会年会講演
- 7) Sinsheimer, R. L., 1960, The Nucleic Acids III Academic Press, New York.
- 8) Stent, G. S. and C. R. Ru-erst, 1955, J. Gen. Physiol. **38**, 441.

大腸菌バクテリオファージ T_3 に関する研究 第2報 T_3 のデオキシリボ核酸の調製と性質*

景 山 眞**

MAKOTO KAGEYAMA : STUDIES ON THE COLIPHAGE T_3 . II. PREPARATION AND SOME PROPERTIES OF T_3 DNA.

〔受稿 3月15日 1961〕

バクテリオファージの増殖において、その本質的な役割はもっぱらデオキシリボ核酸 (DNA) によつて演ぜられていることが明かにされて以来 (Hershey & Chase, 1952) ファージのDNAについて極めて多くの研究がなされて来た。しかし主にT even 系に限られ、 T_3 の研究は少く、未だDNA として調製されても居ない。著者は宿主と T_3 ファージのDNAの関連性を研究する目的で、 T_3 DNA の調製を試みた。前報で述べたように (景山, 1961) T_3 を高度に精製することが出来たので、これから抽出を試みた。収量よく DNA を調製することができたので、得られた標品について化学的性質をしらべこれが高純度の高分子量のものであることを確めた。この結果について報告する。

材 料 と 方 法

バクテリオファージ T_3 は前報に記載した方法により、超遠心およびDEAEセルロースを用いて精製したもので、磷含量、紫外吸収値は前報の通りである。

磷酸の分析は King (1932)の方法に従つた。核酸塩基の分析はペーパークロマトグラフィーによつた。加水分解は Hershey ら (1953) に従い、炭酸ガス封管中 6 N 蒸溜塩酸で 100°C , 3 時間行なつた。加水分解物を減圧乾固後 0.1N HCl にとかし、東洋濾紙 No. 51A の紙でイソプロパノール・塩酸 (Wyatt, 1951) の溶媒で展開し各塩基のスポットを 0.1N HCl で抽出し、紫外吸収の値から定量を行なつた。

* この研究の一部は第33回日本生化学会総会 (昭和35年10月, 東京) において発表した。

** 東京大学理学部生物化学科

実験結果

1. T₃ ファージより DNA の抽出

T₃ より DNA を抽出するために、フェノール法を試みた。(Gieler & Schramm, 1956) ところが T₃ ファージ懸濁液を直接フェノールと振盪したのでは DNA の抽出が極めて悪かった。ふつうに30分程度フェノールと振盪したのでは DNA はほとんど抽出されず、遠心分離によつて各層をわけたとき、DNA は界面の変性蛋白層に残つてしまう。フェノール振盪を長時間くり返し行えば抽出されてくるが、収量は極めて悪かった。

しかしながら、ファージ溶液をあらかじめ酸性に処理した後、中性にもどしてフェノールと振盪すると DNA は容易に抽出されて来ることがわかった。その方法の詳細は次の如くである。

精製された T₃ を含む 0.2M NaCl, 0.005M Tris pH 8 の溶液を氷水で冷し、これに冷い 0.1M 酢酸・酢酸ソーダ緩衝液 pH 4.7 を 1/3 容加えてよくまぜ、氷水中に 5～10 分放置する。これに 1 M Tris 緩衝液 pH 9.3 を加え pH を 8.4 とする。(加えた酢酸緩衝液の 1/10 容)。このように処理した液についてフェノール抽出を行う。フェノールは蒸溜したてのものを 0.005M Tris pH 8 の溶液で洗つて飽和させたものを用い、上の T₃ 溶液に同容加え氷水中で 15 分振盪する。以下の操作はすべて低温で行なつた。遠心分離を行なつてフェノール層を除去する。水層をさらにフェノールと振盪する。遠心分離後水層を保存しておき、フェノール層、変性蛋白層を集めて 0.2M NaCl, 0.005M Tris pH 8 で振盪して再抽出し、この水層を前の水層と合せる。これに水でよく洗つたエーテル同容を加えて振盪しフェノールを抽出しエーテル層をわけとる。エーテル抽出を 5 回行くとフェノールは完全に抽出される。水層に軽く空気を吹きつけて残存するエーテルの大部分を揮発させてから、セロファン膜を用いて蒸溜水に透析する。こうして T₃ DNA の溶液が得られた。アルコールによる沈澱または凍結乾燥で白色の乾燥標品にすることができる。

この方法による DNA の抽出回収率は 90% 程度である。例えばはじめ T₃ 溶液 12ml (総計 T₃ 8.3×10^{13}) から出発して、DNA の溶液として、260m μ の吸光度 3.0 のものが 35ml 得られた。この時の収量は磷の分析値からは 90%、T₃ の磷含量および得られた DNA の $\epsilon(p)$ の値から計算したところではほぼ 100% となつた。

Fig. 1 UV absorption curve of T₃ DNA (—) and T₃ (.....)

2. 抽出された T₃ DNA の性質

このようにして抽出された DNA の紫外吸収曲線を Fig. 1. に示す。pH 7 において、0.001M NaCl 溶液中で吸収極大は 258m μ 、極小 230m μ で、260m μ /280m μ = 1.89, 260m μ /230m μ = 2.1 であつた。比較のため T₃ の紫外吸収曲線も同時に示してある。

またこの DNA について磷を化学的に分析し $\epsilon(p)$ の値を求めた。260m μ の吸光度 3.70 の溶液について磷の分析値は 18 γ /ml という値であつたので $\epsilon(p)$ は 6400 と計算された。

次に DNA を加水分解しペーパークロマトグラフィーによつて塩基の組成をしらべた。T₃ の DNA 溶液の 260m μ 吸光度が 3.0 のもの 7 ml を凍結乾燥し 6 N HCl 1.2ml を加えて炭酸ガス中で加水分解し、再び減圧乾固し、0.1N HCl 0.1ml にとかしてその 0.0 ml ずつを濾紙にかけてクロマトグラフィーを行なつた。その結果は次のようになった。塩基の全量を 100 としたときの分子の比であらわす。

グアニン	・アデニン	シトシン	チミン
25.8 $\pm$ 0.4	24.0 $\pm$ 0.4	24.0 $\pm$ 0.4	26.2 $\pm$ 0.4

この DNA 標品は蛋白質を含んでいない。そのことは紫外吸収曲線からも推定されるが 実際 260m μ の

吸光度1.5のDNA溶液で銅 Folin の反応 (Lowry ら, 1951) は陰性であった。

考 察

T_3 DNA は今まで抽出されていなかった。それは T_3 が多量得がたいこと、今までほとんど精製されていなかったこと、 T even にくらべて蛋白殻が丈夫でこわしにくいということなどによると思われる。滲透圧ショックや音波によつて T even は簡単に DNA を露出するが、 T_3 はこれらの操作によつては DNA を露出しない。直接フェノールによる振盪でも抽出されにくい。これらのことは T_3 が形が小さく、尾の短いことと関係があるかも知れない。

しかるに短時間 T_3 を弱酸性処理をただけで、フェノール処理によつてDNAが抽出されやすくなった。この原因はよくわからないが前報にも述べたように、 T_3 は酸性では失活することから考えて蛋白殻に変化を起したものと思われる。酸性処理だけでは DNA と蛋白は別離しないらしい。それは溶液の乳光、粘度が特に変化しないことから推定される。

フェノール処理は2回行なつたが実際には抽出は1回でほとんど完全に行われている。1回だけフェノール処理 (20分) を行なつたものでも全く同様に純粋なDNAが80~90%の収量で得られた。

この方法で抽出された DNA は紫外吸収曲線から見ても純度が高いと思われる。またその $\epsilon(p)$ の値が6400であつたことは充分高分子のものであることを示し、この方法が DNA を特に傷つけるものではないことを保証している。

塩基の分析値はグアニンとチミンが、アデニン、シトシンよりやや多く、ふつうに見られる $A:T=G:C=1$ の関係より少しはずれた結果となつた。ただし各塩基の比は何れも1にかなり近いといえる。今まで T_3 の塩基組成について正式な報告はなく、非公式な値であるが Knight, Fraser (1954)によると $G:A:C:T=23.5:22.8:26.1:27.8$ とされている。これはどのよう

な標品について分析されたものかわからないが、恐らく超遠心分画によつて調製したものと思われ、精製が充分なものであつたとは考えられない。

上記のように T_3 の塩基組成比はほぼ1に近いが、これは同時に宿主である大腸菌のDNAの塩基組成にも近い。著者は $E. coli$ Bより Zamenhof ら(1956)の方法に従つてDNAを調製し $\epsilon(p)$ 260m μ =6570の標品を得たがそれについて同じ方法で塩基組成をしらべたところ、 $G:A:C:T=25.7:24.4:26.0:23.8$ という値を得た。その塩基組成が宿主のDNAのそれに近いということは、 T_3 ファージが T even 系ファージと区別される一つの特徴であろう。

総 括

1. バクテリオファージ T_3 からフェノール処理によつてDNAを抽出することができた。 T_3 をあらかじめpH4.7に処理しておいてのち中性にもどして、フェノール抽出を行うと収量よく抽出されてくる。
2. 抽出されたDNAは $\epsilon(p)=6400$ で紫外線吸収値から見て純粋で高分子量のものと思われる。
3. 得られたDNAの塩基の分析を行なつた。組成は $G:A:C:T=25.8:24.0:24.0:26.2$ であつた。

本研究にあたり御指導をいただいた渡辺格教授に感謝する。研究費用の一部は文部省科学研究費によつた。

文 献

- 1) Knight, C. A., & D. Fraser, 1954, Adv. Virus Res. **2**, 153.
- 2) Gieler, A., & G. Schramm, 1956, Z. Naturforsch. **11**, **b**, 138.
- 3) Hershey, A. D. & M. Chase, 1952, J. Gen. Physiol. **36**, 39.
- 4) Hershey, A. D., J. Dixon & M. Chase, 1953, J. Gen. Physiol. **36**, 777.
- 5) 景山真: 1961, Virus **11**, 291.
- 6) King, E. J., 1932, Biochem. J. **26**, 292.
- 7) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall, 1951, J. Biol. Chem. **193**, 265.
- 8) Wyatt, G. R., Biochem. J. **48**, 584 (1951)
- 9) Zamenhof, S., B. Reiner, R. De Giovanni & K. Rich, 1956, J. Biol. Chem. **219**, 165.