

分子生物学 (III)

IV 遺伝子の微細構造解析

福留秀雄(基研)

§ 1 微細構造とその解析法 (Cis-trans test)

遺伝子は生物の形質を決定する最小の単位であり、同時に組み換え (recombination) の起る単位でもあり、更に突然変異の起る最小の単位でもあると考えられていた。そして、分子レベルで見れば、一つの遺伝子が一つの酵素を決定しているのではないかという説が Beadle と Tatum によって提唱されていた。

ところが遺伝子分析の精度が増すにつれて形質発現の機能、組換え、突然変異の各単位は同じものではないことがわかってきた。実際、同じ形質に対する突然変異といつても、その形質を決める DNA の領域に変異の起っている部位は様々であり、それに対応して、同じ形質に対する変異株にも多くの種類のあることがはつきりしてきた。

1. cis-trans test と cistron:

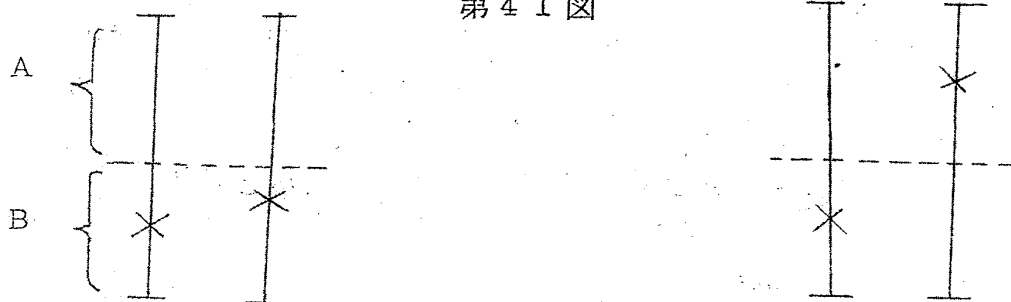
今2つの株の交配を行つて、遺伝子の2倍体をつくつた場合、第40図に示すように各遺伝子が一つずつ突然変異を受けているときその二倍体は trans 位置の変異を受けているといい、一方の遺伝子の上に二つの変異が起っているとき、それらは cis 位置の突然変異を受けているという。突然変異が cis 位置に起っているときは野性型の形質が発現され、trans 位置に変異の起っているときは野性型の形質が発現される場合と突然変異型の形質が発現される場合があることが明らかになつてきた。

それで Benzer は同一形質についての変異株ではあるが DNA 上で変異を受けている部位の異なる様々なもの同志の交配を行つて、いろんな trans 位置の変異の効果を調べた結果或る場合にはこれらの変異株は2つのグループ A, B に分類することができて、A グループに属する変異株同志又は B グループに属する変異株同志の交配では突然変異型の形質しか現われないが、A

福留秀雄

グループのものと、Bグループのものの交配をすると野性型の株がでてくることがわかった。そしてこの一つのグループに属する任意の変異株のDNAにおける突然変異の部位は第41図に示すようにその形質に対応するDNAの領域

第41図

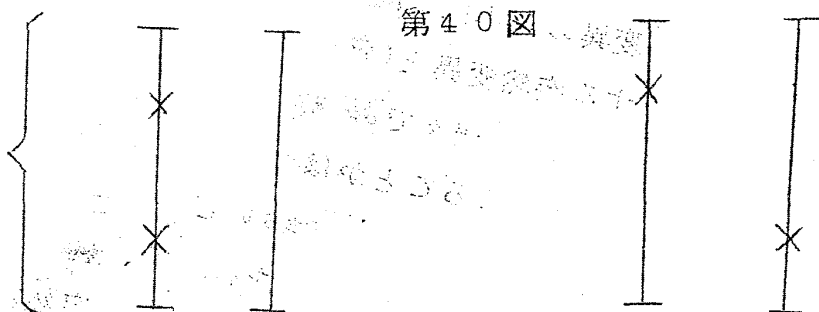


(a) 突然変異型の形質を発現する。

(b) 野性型の形質を発現する。

第40図

ある形質の突然
変異に関する
DNA上の領域



(a) a cis-位置に変異をもつ遺伝子の2倍体

(b) trans位置に変異をもつ遺伝子の2倍体

をあるところで2分して分けた一方の領域例えば第41図におけるAに属し他のグループの変異の部位にもう一方の領域Bに属することがわかった。このことは形質発現の機能の最小単位はDNAの領域A, B, であつて、第41図(b)のように親の遺伝子が別々の機能単位に変異を受けているものであれば、一方の遺伝子が失っている機能単位を他方の遺伝子の正常な機能単位が補つてくれ形質発現は全体として正常の場合と同じように行われることを示す。この現象は complementation とよばれる。

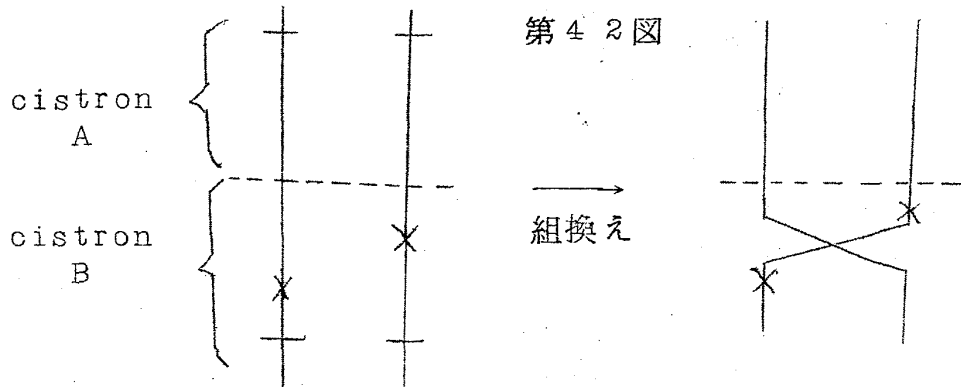
またこのようにして同一形質の変異株をグループに分けることを cis-trans test とよび、この cis-trans test で決定される形質発現に対する機能の最小単位(第41図におけるDNA上の領域A及びB)に Benzer

は cistron という名を与えた。

この cis-trans test は変異の数を増やすことによつて1つの形質に対応する遺伝子が三つ以上の cistron から成り立っている場合にもそのまま拡張され一つの遺伝子を構成している cistron の数を実験的に決定することができる。

2. muton と recon:

第41図(a)のように同一 cistron に trans 型の変異が起つている場合に発現される形質は突然変異型であつた。しかし更に精度を上げて実験をしてみるとこのような交配に対しても野性型のでてくることがあることがわかつた。これは交配を行う二つの cistron において変異を受けた部位が同じでないときには非常に低い割合ではあるが起りうることで、これは第42図で示すような組換え (recombination) が起つたのだと考えることができる。



このように組換えによつて移しかえることができかつ変異を起しうる最小の単位を考えて Benzer はこれを muton と呼んだ。

Watson Crick のモデルで考えるならこれは核酸の塩基一個の大きさに相当すると考えられる。上の説明からもわかる通り、組換えの起こる単位を考えるなら、その大きさは cistron に比べてはるかに小さく muton とほぼ同じ程度の大きさである。この組換えの起る最小の単位に彼は recon の名を与えた。

§ 2 Benzer の実験:

上に述べた遺伝の最小単位である cistron, muton, recon の大きさが

福留秀雄

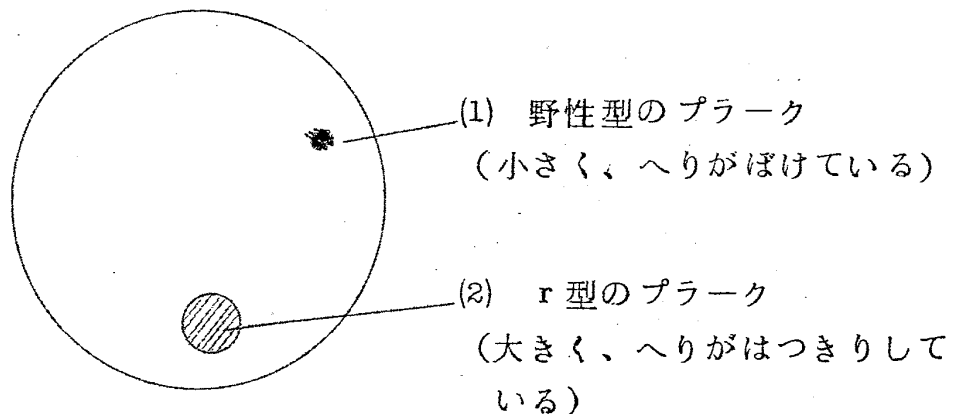
DNAの分子構造と対比させたならどのくらいの大きさになるかを Benzer は遺伝学的方法によつて決定した。以下のような実験を可能にするために彼の選んだ実験系から話を始めよう。

T_4 ファージ \ 宿主	E. Coli B	E. Coli K 12
r^+ (野性) 型	野性型の Plaque	野性型の Plaque
r^- 突然変異型	r^- 型の Plaque	Plaque を全然つくらない

第 7 表

第7表は T_4 ファージの野性型（これを以下 r^+ とかく）とこの変異株である r^- 型の各々が、E Coli BとE Coli K 12の各々を宿主とした時の Plaque の形態を示したものである。ここに野性型の Plaque は第43図(1)に示されて

第 4 3 図



いるように小さいへりのぼけている Plaque であり、 r^- 型の plaque は第43図(2)に示されているように大きいへりがはつきりしたものである。

さて第7表からわかるように r^- 型の T_4 ファージは E. Coli K 12 株の皿の上では全然 plaque を作らない。それ故もし時間が経つて野性型の plaque ができたとするむらばそれは r^- 型株から何らかの原因で r^+ 型株ができてそれが増殖してつくった plaque に他ならないと考えることができる。従つてそのプラークの数を数えることにより、何個の r^- 型株が r^+ 型株にかわつたかを知ることができる。

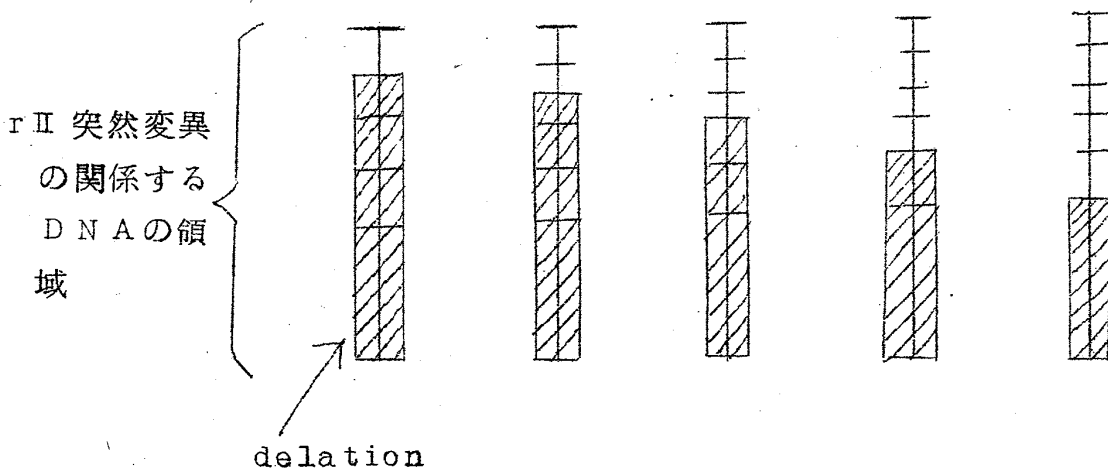
1つのシャーレの上には 10^8 個またはそれ以上のファージをまくことができるので、その中に一個だけでも r^+ 型ファージが混つていたらそれを容易に探

知出来非常に低頻度で起る事象を非常にはつきりと見ることができる。それで Benzer は *E. Coli* K 12 株上でいろんな r_{II} 変異型の T_4 ファージの交配を行い cis-trans test を行つた。その結果 r_{II} 型の突然変異に関係している DNA の領域は二つの cistron から成ることがわかつた。ここでファージの交配とは2種のファージを同一宿主の中で増殖させることを、その結果組換え型のファージのでてくることのあることから、そのようによぶ。

次に r_{II} 型の T_4 ファージを変異の起つている cistron の違いによつて二つのグループに分け、同じ cistron に変異をもつもの同志の交配を *E. Coli* B 株で行いその子ファージを再び *E. Coli* K 12 の皿の上にまけばかけ合せた2つの変異株の各 DNA にもつ変異の間の距離に比例して、その子孫の中に wild 型の組換え型がまじつてくるのを容易に捕えることができる。従つてどれか一つの変異株を標準にとることによつてその cistron 上のどこに他の変異株の突然変異が起つているかを知ることができその結果各 cistron 内の突然変異地図ができるはずである。このためには非常にたくさんの r_{II} 型のかけ合せによる、wild revertant のでてくる頻度を測るのであるが、Benzer はそれに代りうるうまい便法を考えた。

deletion という突然変異は一ヶ所に突然変異が起つている突然変異とは異なり、遺伝子のある部分がごつそりぬけてしまつている突然変異である。そこで第 4 4 図に示すように欠けた部分がわかつている deletion 株をいろいろ用意しておいて、位置を決めたい普通の point mutation 株とかけ合せを行う。

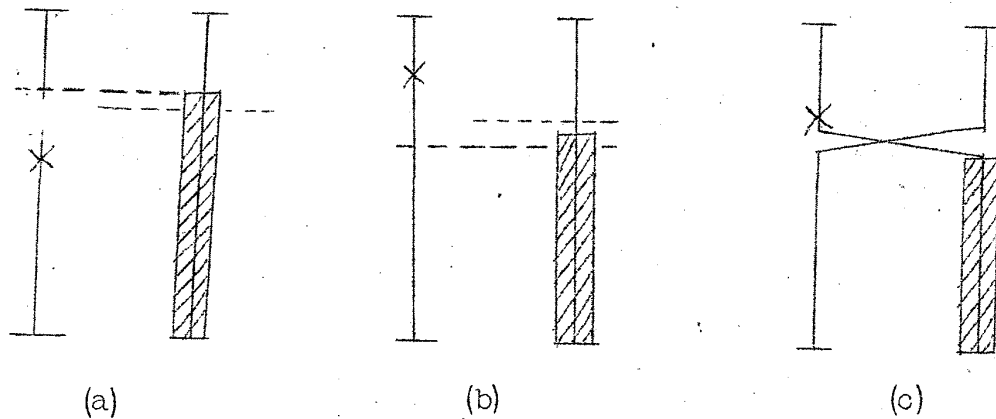
第 4 4 図



福留秀雄

その際第45図(a)のような場合には例えばどこで組換えが起つても野性型のフージは現われない。それに反して同図(b)のような場合には多くの中に同図(c)のような組換えが起つたものもでてくるであろう。それを探知することによつ

第45図



て知りたい point mutation の位置は(a)と(b)で使つた二つの deletion 株の一方では変異を起しているが他方では変異を起していない DNA の領域にあると結論できるはずである。

そこで次に、今使つた deletion 株の一方が変異を受け他方は変異を受けていない領域の丁度中点まで deletion ののびている株で同じことをやってみると、求める point mutation の範囲を半分ちぢめることができ、こうした方法で cistron を何個かの segment に分け point mutation の位置を大体決定できる。そして後は同一 segment 内の位置の分っている point mutant との組換え実験により新しい mutation の位置を正確に決めることができる。このようにして Benzer は 145 の deletion 株をつかつて 308 個の point mutation を起している、場合の異なる rII 変異株を見つけた。現在ではその数は 1000 個以上にのぼっている。

§ 3 Cistron , recon , muton の大きさ

Benzer は組換え実験から rII 型の突然変異を起す遺伝子の Acistron の大きさは 5 rec. unit rII B cistron は 3 rec. unit であることを決定した。但し、1 rec. unit (recombination unit) とは 100 個掛け合せをやつて

一つの組換え型のでてくるDNA上での距離をいう。T₄ファージのDNA全体は 2×10^5 base pair からなりこれは 200~800 rec. unit (平均で 500 rec. units) に相当するから rII A cistron の大きさは $2 \times 10^5 \times \frac{5}{500} = 2 \times 10^3$ base pair rII B cistron の大きさは $2 \times 10^5 \times \frac{3}{500} = 1.2 \times 10^3$ base pair ということになる。

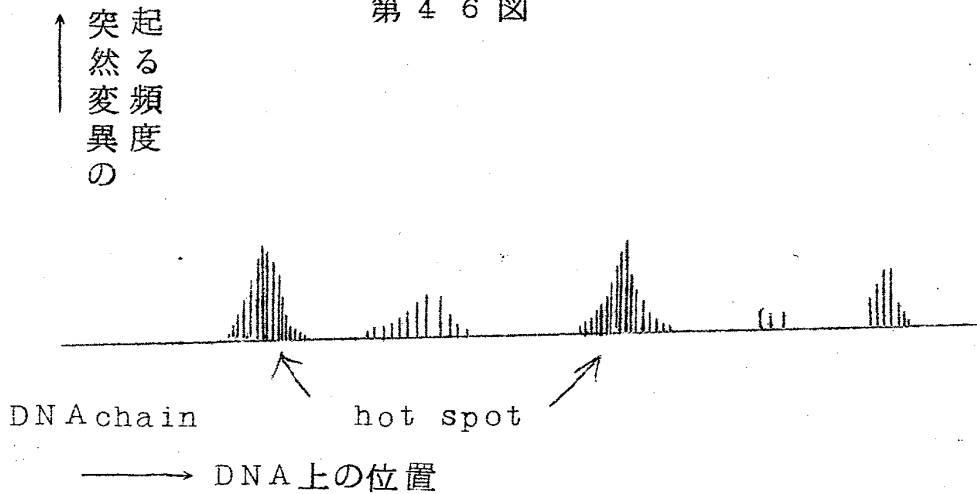
この大きさは 100 個程度のアミノ酸から成る polypeptide chain を決めるのに丁度よい大きさである。それで Benzer は 1 つの cistron が一つの polypeptide chain を決定するという説を提唱した。

次に Benzer によつて見出された recombination の最小の頻度は約 0.02 rec. unit であり、これは大体 $2 \times 10^5 \times \frac{0.02}{500} = 8$ base pairs に相当する。この実験値は recon の上限をおさえたものであつて実際の recon の大きさはこれより小さいと考えられる。又 rII A cistron において Benzer が観測した異なる突然変異の数は 308 個であつたが突然変異の起る位置の分布が poisson 分布になるとして観測されたものから推定すると未だ観測されていない突然変異の数は 120 個あると考えられ rII A cistron の total mutons は結局約 400 個と考えられる。rII A cistron の大きさは 2×10^3 base pairs であつたからこれから muton の大きさは $2 \times 10^3 \times \frac{1}{400} = 5$ base pairs ということになる。この値も muton の大きさの上限をおさえたものであつて理論的には muton は 1 base pair であると考えられる。

ところで Benzer が組み換えの起ることから区別することのできた DNA 上の最小距離は約 8 base pair に相当する。これは遺伝学的な研究方法のもつ分解能が 27.2 \AA というおどろくべき精度であつたことを示している。

更に、Benzer は突然変異を起すいろんな agent を DNA に作用させてどの場所にどのような頻度で突然変異が起るかを作用させてやる agent によつて第 46 図のように突然変異のさかんに起る場所のあることを発見した。そのような DNA 上の位置を hot spot という。勿論 hot spot は作用させてやる agent の種類によつて違ふ。それで、もしどの agent がどのような突然変異を誘起するかがわかるならば DNA 上の base pair がどのように配列しているかを遺伝学的な研究だけから知ることが不可能ではない。

第 4 6 図



§ 4 突然変異の分子的機構

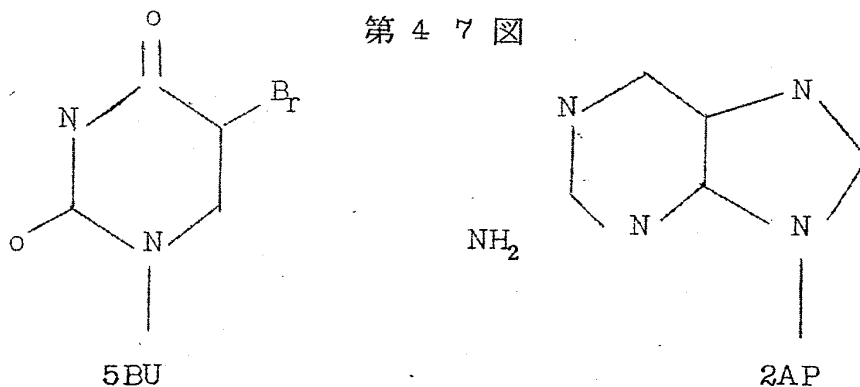
Watson Crick model によれば、突然変異は DNA の増殖の際につくられる base pair が正しくつくられなくて一部間違ふことによつて生ずると考えられ、また突然変異を誘起する agent はその組み換えを促進させる物質であると解釈することができる。

突然変異を誘起する agents には化学的なものとして化学構造が DNA base に似た化学物、そして亜硝酸 HNO_2 、アクリジン系の色素 (acridine dyes) 等があり、物理的なものとしては紫外線、x 線、放射線 (荷電粒子線) 等がある。これらの agent がどのように突然変異を誘起するかを次に述べることにしよう。

1. Base analogue の作用：

第 4 7 図に示した 5BU や 2AP は正常な DNA base と非常によく似ている

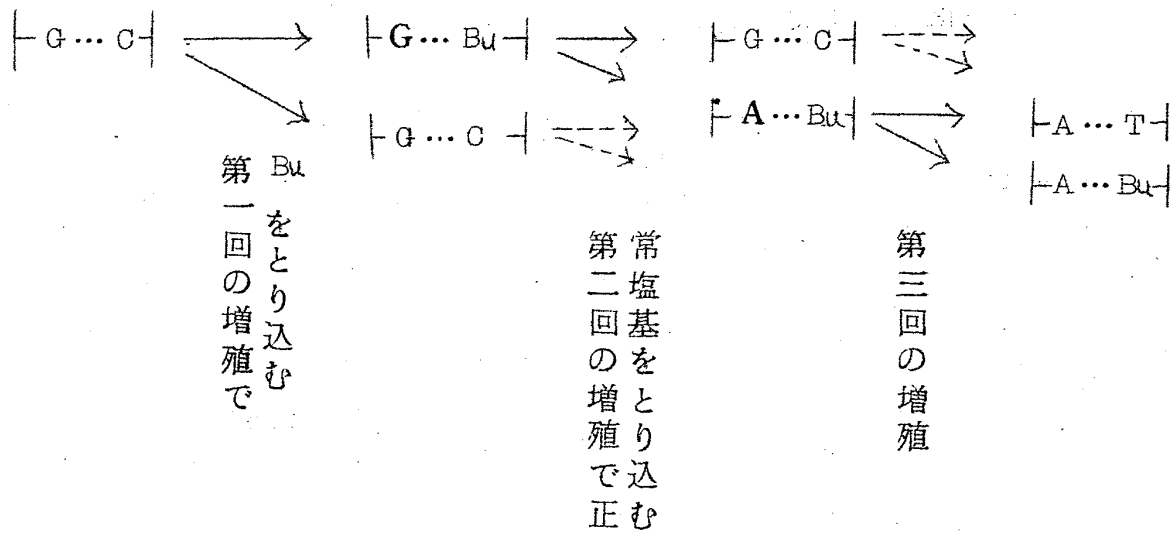
第 4 7 図



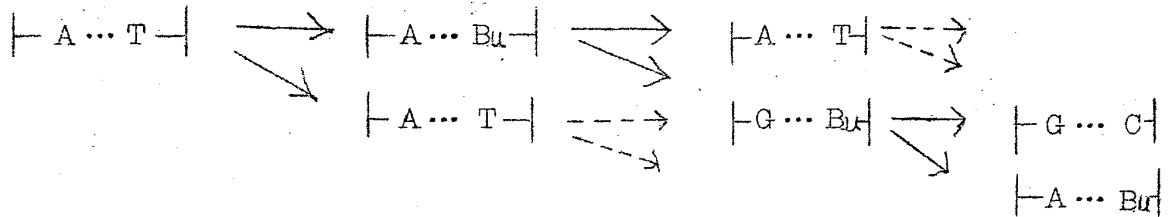
ので DNA が増殖する際正常な base と間違えられて DNA の中にとり込まれる。5BU と 2AP は二種類の正常な base と水素結合をつくることのできる。即ち 5BU は G または A と pair をつくり、2AP は T または C と pair をつくる。従つて 5BU や 2AP はこれらの二つの正常な base を区別することができないので次の増殖以後において間違いが生ずる事がある訳である。その過程を図示すれば第 48 図の様になる。base analogue で誘起される突

第 48 図

(a) G-C pair が A-T pair になる間違いの起る機構



(b) A-T pair が G-C pair になる間違いの起る機構



然変異は purine-pyrimidine pair を purine-pyrimidine pair にかえる型で、二の型の突然変異は transition 型と呼ばれる。

2. HNO₂ の作用

HNO₂ は DNA base に直接作用して NH₂ を OH で置換する反応をおこし、その結果 C を U に、また A を HX に、G を X にかえる。但し X はクサンチン

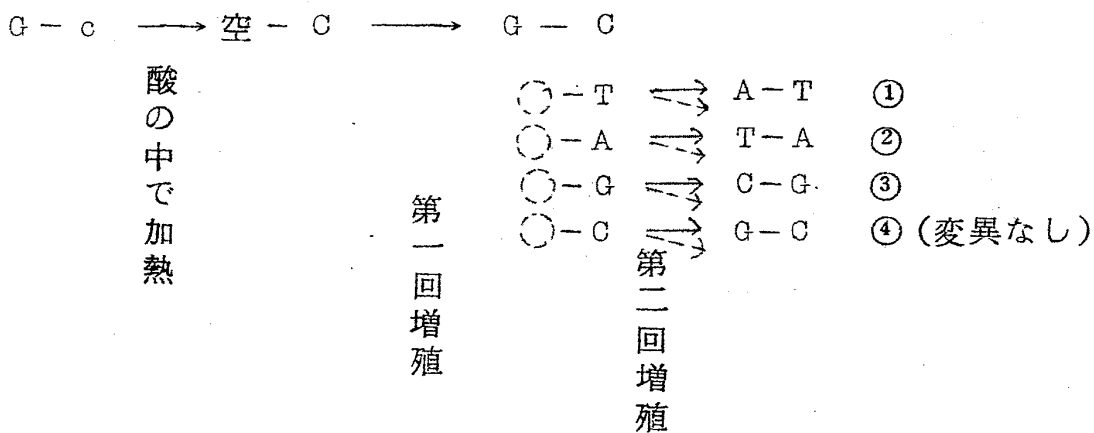
福留秀雄

(xanthine) を表わす*。そしてHX はあたかもGの如くふるまい、またGが変化してできたXはそこでDNAが増殖できないようにしてしまう。上のことからわかるようにHNO₂によつて誘起される突然変異もまた transition型である。

3. 酸の中でDNA又はRNAを加熱した場合

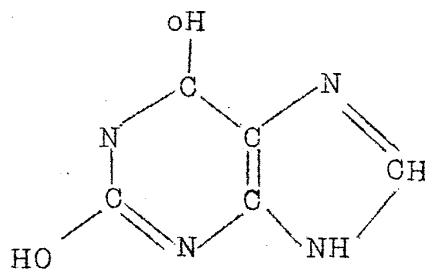
このときはDNAの中の purine が sugar の端からとれ (脱 purine) purine のあるべき部分が空っぽになる。そしてDNAが増殖するときそのぬけ穴の相手にはどの base でもやつてくることができるのでその部分からは全く勝手な base pair がつくられる。例えば脱 purine の例としてG-C pair のGがとれた場合を考えるとそれが第二回の増殖の際つくりうる新しい pair の可能性は第49図の如くなる。

第 4 9 図



この図からわかるように第二回目の増殖の結果できうる base pairのいろんな場合の中①が起つたなら、これは transition 型の突然変異が起つたことになる。ところで②、③のG-CがT-A又はC-Gに変わったのは purine-

* Xanthine の分子式

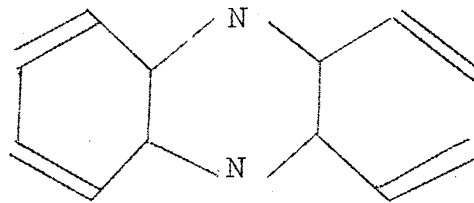


pyrimidine pair が pyrimidine-purine pair 又は pyrimidine-purine pair になつたので transition 型ではないこのような 突然変異を transversion 型とよぶ。この transversion 型の突然変異は自然条件の中ではあまり起らないものと考えられている。

4. アクリジン色素の作用

第50図はアクリジン色素の構造を示したものである。これはDNAに非

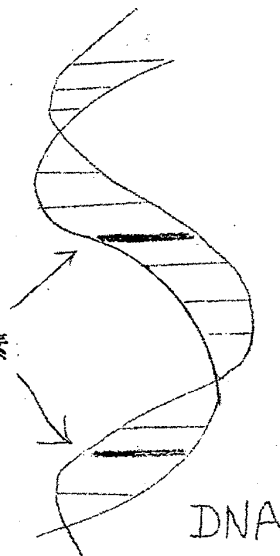
第50図



常によくくつつく。そのくつつき方は第51図に示すように、DNA base

第51図

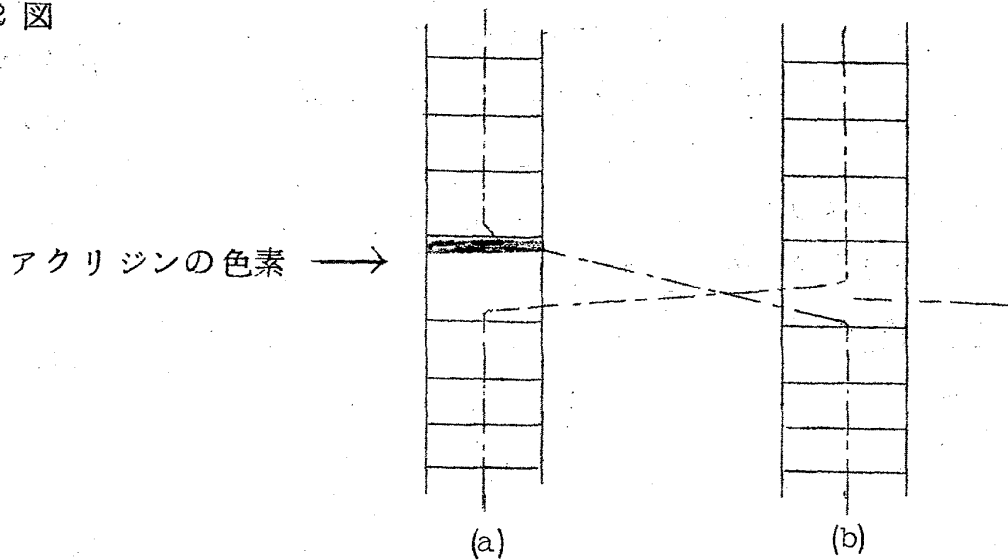
アクリジン系の色素



の間にはさまるらしい。この事は、この色素が $305\text{ m}\mu$ に強い吸収をもち核酸の吸収は $260\text{ m}\mu$ なので、 $305\text{ m}\mu$ の光を流動的に長くのばしたDNAに吸収させてその吸収の異方性を測定してやることによつて結論された。

この色素が突然変異を起すメカニズムは組換えの際の間違いを誘起することにあるらしい。即ち第52図の(a)は1個のアクリジン色素がはさまっているDNAであり、この分子ははさまった色素のために1 nucleotide 長くなっている。それが図に示すような組換えを起すと一方のDNAは

第 5 2 図



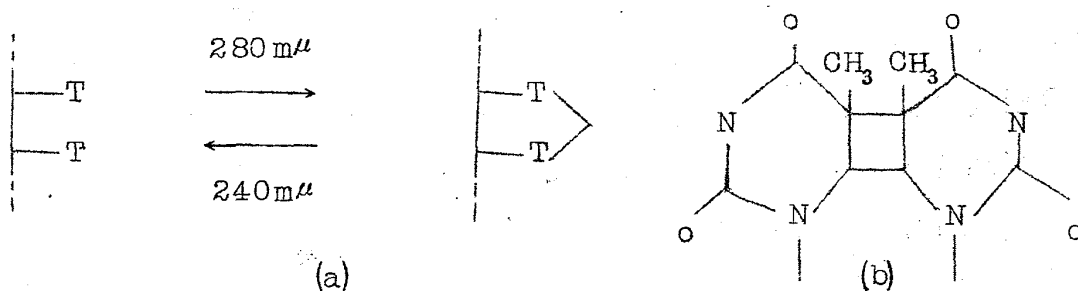
1 nucleotide 長い分子になる。これは insertion とよばれる。その際は
 さまれていた色素は組換えの際とれると考えると、できる DNA 分子のもう一
 つは 1 nucleotide だけ短い。これは deletion である。

5. 紫外線の作用

紫外線は DNA の base に光化学反応を起させる。特に長波長の紫外線例え
 ば $280m\mu$ の光を DNA にあててやると二つ並んだ T に対して dimer をつくる
 確率が高い。その様子と、できる dimer の構造を第 5 3 図(a), (b)に示す。
 面白いことには、この反応は可逆的で、短波長の紫外線例えば $240m\mu$ の光で
 もとの二つの monomer に相当部分もどる。

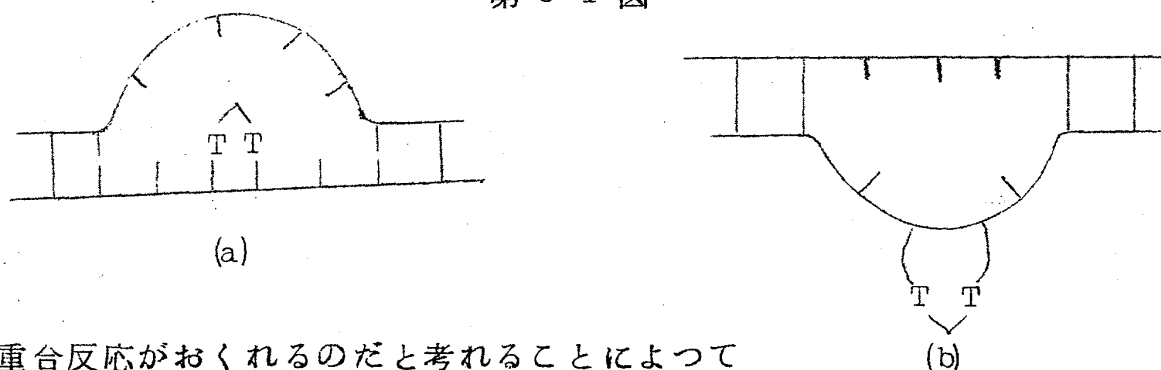
一旦 dimer $\overset{\wedge}{T T}$ ができるとこれは相手の base と水素結合をつくらな
 いため DNA が増殖する際 dimer の相手にはどんな base でもつくりることが出来
 るか又はその部分を飛ばして増殖が進むと考えらる。

第 5 3 図



その様子は第54図(a)または(b)のようになっていると考えられる。実際紫外線を沢山あてたDNAを primer として Kornberg の DNA polymerase で DNA をつくつてやると primer に当てておいた紫外線の量に比例して DNA の重合反応がおそくなる。これは水素結合のできない dimer T T のところ

第54図



で重合反応がおくれるのだと考えることによつて説明される。

以上が現在理解されている突然変異の分子的機構であるが組換え現象の分子的機構に関しては組み換えを促進させる recombinationase というべき酵素があるのではないかともしられているが現在あまりよくわかっていない。

VI 核酸 (DNA) の物理化学

§ 1 DNA の性質

DNA と RNA とでは物理化学的に可成の違いがあるがここでは DNA について述べよう。

1 分子量

先ず、二、三の種の DNA の分子量を示すとフアージでは 1 個体当たり 1 DNA 分子と考えられこれは $120 \sim 130 \times 10^6$ である。またバクテリアの DNA の分子量はほぼ 10^9 と考えられている。Calfthymus では $6 \sim 8 \times 10^6$ といわれているがこれは DNA 分子がばらばらになつたものの中の一つの値

福留秀雄

なのかもしれない。

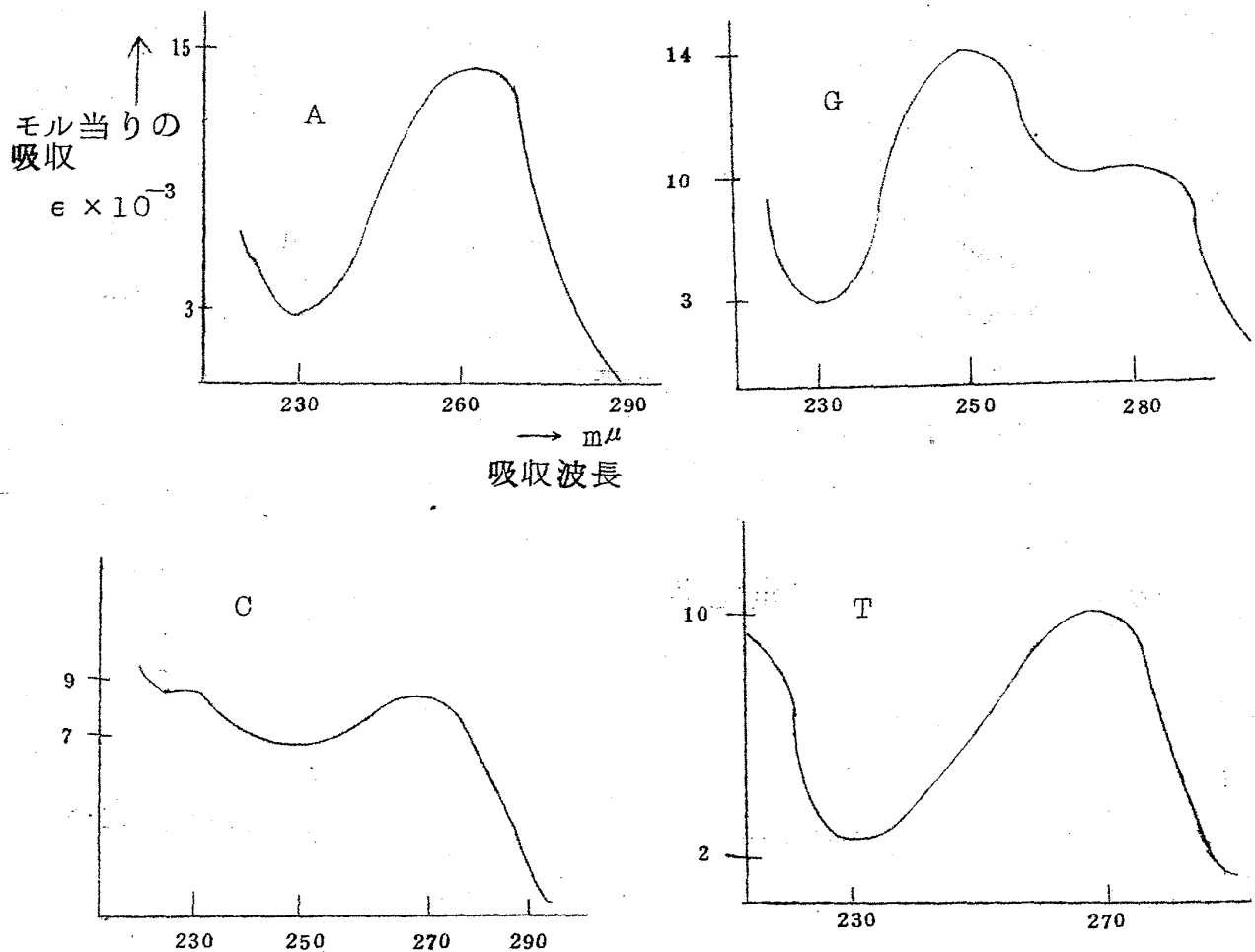
2. 分子形

次にその分子の形であるが、Watson Crick モデルからDNAは二重に巻いたらせんでありはしご状のbridgeのためかなり硬く曲げにくいと考えられる。これは物理化学的にも確められている。

3. 光吸収

DNA分子は紫外部260m μ にbroadで強い吸収をもつ。これは4種のbaseの π electronのtransitionによる吸収と考えられる。但し各baseが単独のときの吸収曲線は第55図に示した通りである。

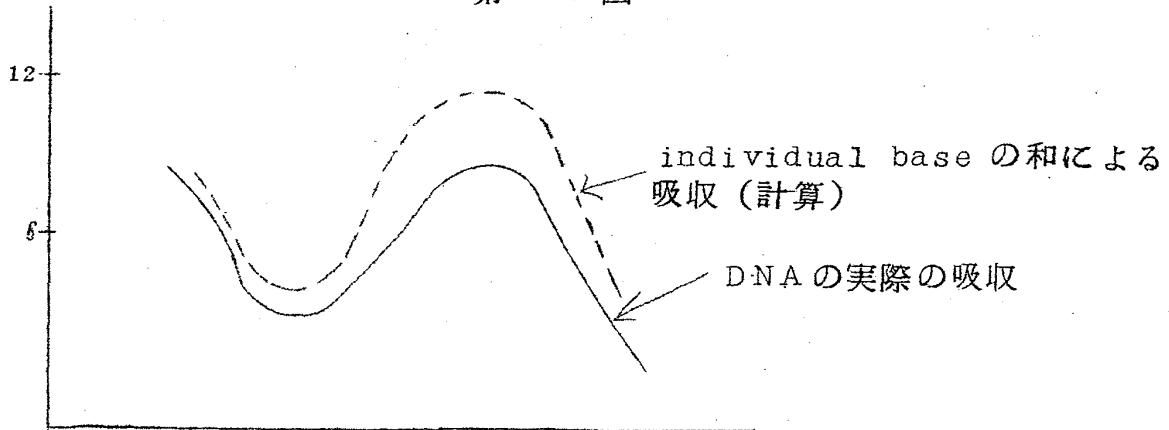
第55図



DNA分子のこの吸収は核酸の量の定量に用いることができる。またDNAの吸収は状態変化によつて変化するので状態変化を探知するためにも使うことができる。

ところでDNA全体の吸収は第55図に示したbase単独のときの吸収の和より小さく出る。その様子は第56図に示した通りでこれを核酸の

第56図

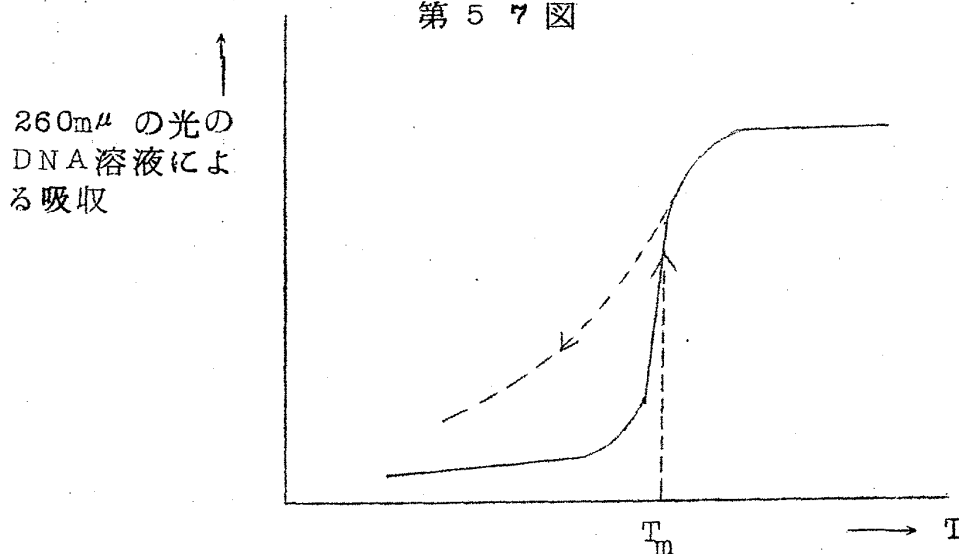


hypochromicity と呼ぶが、これは核酸の base の積み重ねの効果 (stacking) によつて base の有効遷移確率が小さくなることによると考えられる。

4. DNAのdenaturation (melting)

DNA溶液の温度を上げながら260m μ の光の吸収を測つてやると第57図に示すようにある温度 T_m までほぼ一定で T_m から上で急に吸収が増しその後の

第57図

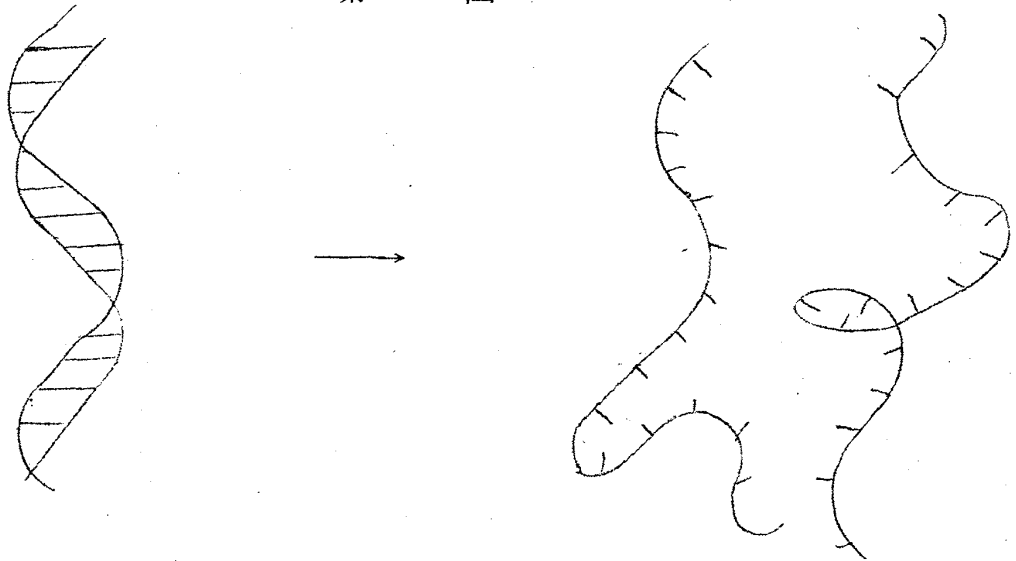


温度で吸収は又一一定となる。次に冷やしなから吸収を測定してやると第57図において点線で示すようにもとのもとの道をたどらない。ゆつくりと冷や

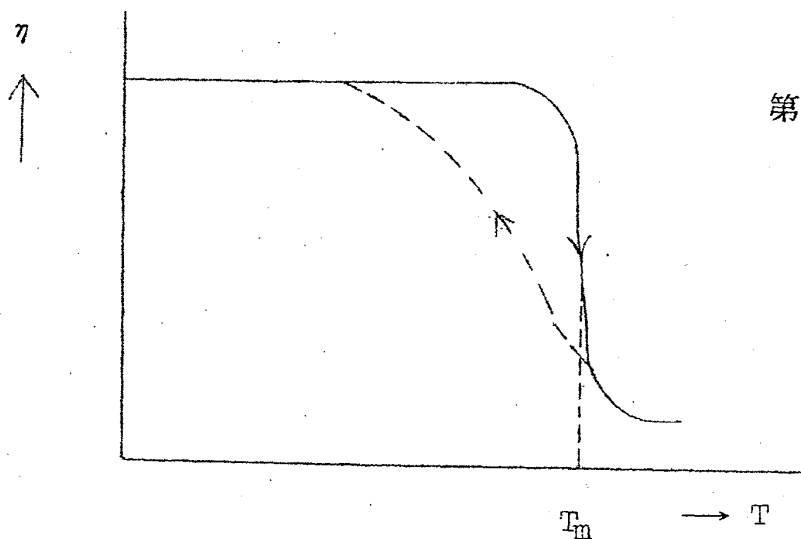
福留秀雄

せばこのヒステリシスはある程度少くなりその程度に応じてもう少しもとの経路に近い線が得られる。この結果は溶液中で温度を増していったとき T_m で DNA の double strand の水素結合がきれて base stacking がこわれるものと解釈される。(第 58 図)

第 58 図



次に DNA 溶液の粘性を温度を上げながら測定してやると第 59 図に示すように温度 T_m まで一定でそこで急に減少する。次に温度を下げていくと同

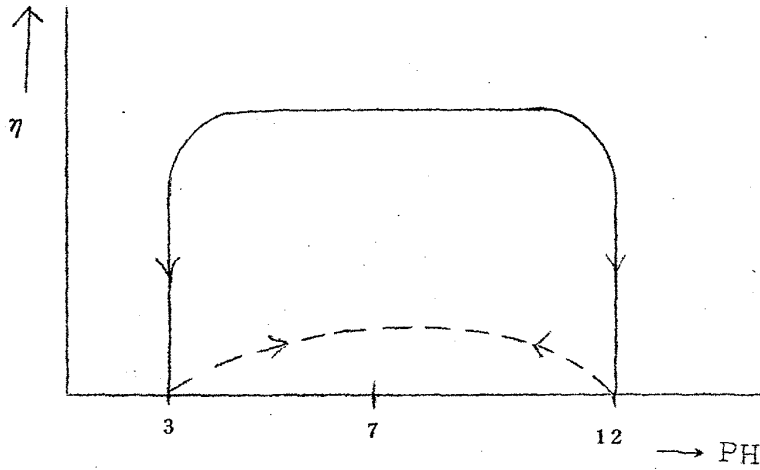


第 59 図

図の点線で示すように T_m から後だらだらともともにもどつていつてやはりヒステリシスをもつ。この結果もまた T_m で stiff coil が random coil になることを示すものと考えられる。

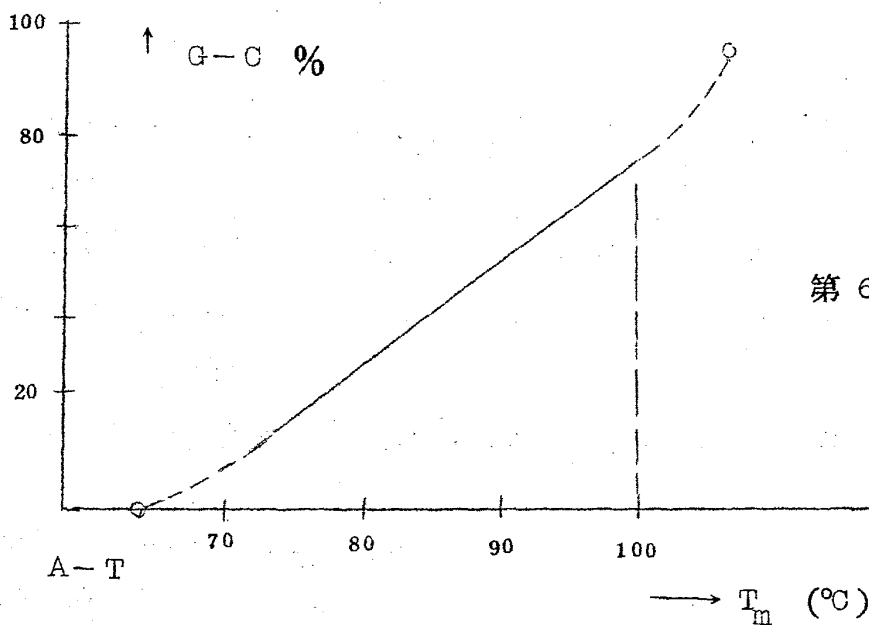
今度は粘性 η がPHによつてどう変化するかを調べると第60図のような結果が得られる。

第60図



即ち、溶液のPHを下げていくとPH3あたりで急激に二次構造がこわれその変化は不可逆的である。またPHを上げていった場合にもPH12のあたりで同じく二次構造がこわれこの変化もまた不可逆的である。

Watson Crick モデルによるとA-T pairは2本の水素結合をつくるのに対して、G-C pairは3本の水素結合をつくる。従つてA-T pairに対してG-C pairを多く含むDNAの T_m はその比が大きいほど高いと考えられる。第61図に示す実験結果はこの考え方が正しいことを示している。



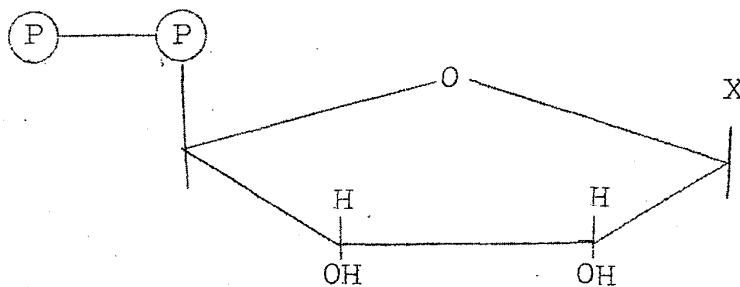
第61図

福留秀雄

結局、以上のデータはすべてWatson Crick モデルを支持するものである。

§ 2. 合成核酸の性質

Ochoa は E. Coli の中から XDP より primer なしで polyribonucleotides を合成する酵素 (polynucleotide phosphorilase) を抽出した。この酵素は生体内では合成よりむしろ分解に使われているらしい)。第 6 2 図に XDP の構成式を示しておく。但し X は U, A, C または (G) (G は合成核酸をつくる場合入りにくい) のどれかである。



第 6 2 図

合成 RNA は生体の RNA ではないが化学構造は全く生体の RNA と同じものである。但し base の並び方は生物から information を得ずに単に重合反応でつくつたので一般には特別の意味をもたない。U, A, C, (G) だけから成る poly RNA を poly U, poly A, poly C, (poly G) と呼ぶ。

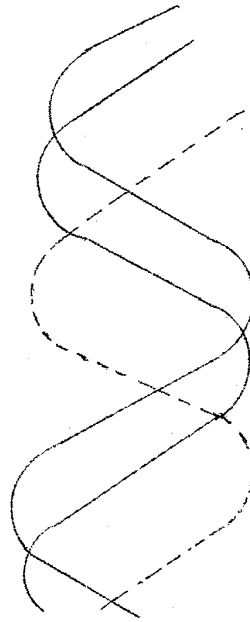
上のようにして合成した poly A と poly U をまぜてやると DNA like の double strand をつくるのが hypochromicity, sedimentation (沈降連層) X ray-pattern 等からわかっている。

また poly A と poly U を 1 : 2 の比でまぜてやると M_g の存在下で triple strand ができることがわかっている：これは poly A-poly U の double strand の深い方の谷に poly U が巻きついて第 6 3 図に示すような配置をとっていると考えられている。更に poly A だけでも酸性溶媒の中で parallel double strand をつくりそれは DNA 等の antiparallel とものと異なり第 6 4 図に示すような配置をとると考えられている。

(分責 谷川 義昭
吉森 昭夫)

第 6 3 図

実線が poly A - poly U の double strand
点線がこれにまきついた poly U



第 6 4 図

