

學位申請論文

猪子英俊

大腸菌における転写終結因子(ρ)
変異株の分子遺伝学的研究

猪子英俊

京都大学大学院理学研究科
(化学専攻) 博士課程
(昭和50年3月所定単位取得)

大腸菌における遺伝情報の転写調節機構を明らかに
する目的で、転写の開始から終結に至る各段階(特に終結段
階)に直接に関与する因子の変異株を分離し、生体内機作の遺
伝生化学的解明を試みた。この試みを実現する手段として、 λ
ファージ感染系を利用した。 P_2 溶原菌(S_{0-})はいわゆる P_2 ファージ
干渉(spi)現象により野生型 λ^+ (= spi^+)に抵抗性をしめす
が、 $\lambda_{sus N_7 nin 5}$ (= spi^-)には感受性をしめす。この P_2 溶
原菌から突然変異誘起剤処理により $\lambda_{sus N_7 nin 5}$ に対し抵抗
性をしめす宿主変異株(nit 変異株 = N independent trans-
cription)を選ぶことによって、 N 蛋白がなくても λ ファージなオペロンの
CIII- att 領域の転写が可能なる変異株を選別的に分離
することができた。こうして得られた多数の nit 変異株のなかの1
つのグループ $nit A$ 変異株は $\lambda_{sus N_7 nin 5}$ に抵抗性をしめす
が、 spi 遺伝子が欠失している $\lambda_{sus N_7 nin 5 spi}$ には感受性を
しめす。また $nit A$ 変異株から P_2 ファージを除けば、 $\lambda_{sus N_7 nin 5}$
に感受性をしめす。以上の事実より、 $nit A$ 変異株に $\lambda_{sus N_7 N_{53} p_{trp 46}}$
を感染するとトリプトファン(trp)オペロンの酵素合成が観察される事実

は, *nit A* 変異株では確かに *N* 蛋白に依存せずに *III-att* 領域の転写が可能であることを示唆している。この *N* 非依存性の転写は *CI* リプレッサーにおいて抑えられるので, *P_L* プロモーターから開始していると考えられる。すなわち *nit A* 変異株では転写終結に関与するある因子が変化していることが明らかになった。一方 *nit A* 変異株では, 右オペロンの *CII-O-P* 領域の転写も, 同様に *N* 蛋白に依存しない事実が観察された。*nit A* 変異は染色体上の *III-met E* 遺伝子間に位置し, 野生型に対し劣性をしめす。

一方 *nit A* 変異株では, 転写終結因子 ρ が変化していることが我々の研究室で行われた生化学的解析により明らかにされた。すなわち *nit A* 変異株より精製した ρ 因子は転写終結活性が親株の ρ 因子の約 20% に低下しており, トリプシンに対する感受性も親株のそれと比べて著しく増大している。これらの事実により, 生体内における入力-ジの転写終結には確かに ρ 因子が機能していることが実証された。次に大腸菌の転写終結における ρ 因子の関与を明らかにするために 高温致死性 *nit A* 変異株の分離 を

試み、2株(1株はアンバー変異)の nit A^{ts} 株も得た。これらの変異株は低温(30°C)で $\lambda_{\text{SOS}} \text{N7 min 5}$ に対し、先の $\text{nit A}^{(ts+)}$ 変異株より強い抵抗性をしめす。 nit A^{ts} 株は高温(42°C)で RNA、蛋白合成を継続するが、その生存菌は高温移行後約30分から対数的に減少してゆく。 nit A^{ts} 変異株では λ フェージの P_L 、および P_R プロモーターより開始される転写は、N 蛋白に依存することなく、多量 下流に位置する遺伝子群まで継続する。特に、 nit A^{ts} 株に $\lambda_{\text{SOS}} \text{N7 N53 ptp 46}$ を感染すると P_L プロモーターより開始した転写が終結できず、その結果 read through により tpo オペロンの酵素が合成され、その転写量は $\text{nit A}^{(ts+)}$ 変異株に比べ約10倍多い。

nit A^{ts} 株が生産する ρ 因子は我々の研究室で精製された。その結果 nit A^{ts} 株の ρ 因子は 45°C 10分間の熱処理でほぼ完全に失活し、野生型の ρ 因子に比べはるかに熱不安定性をしめす。また、その他の生化学的諸性質(転写終結能、分子会合能、核酸結合能など)についても、野生型 ρ 因子と著しく異なっていることが明らかになった。以上の事実は

nitA が ρ 因子の構造遺伝子であり、 ρ 因子による正常な転写終結が大腸菌の転写調節に必要な素過程であることを示唆する。

目 次

1. 序 論

1-1. 大腸菌における RNA 合成開始の制御機構	頁 1
1-2. オペロンの非保存性	5
1-3. λ ファージの転写調節	8
1-4. λ ファージの転写調節における宿主の関与	10
1-5. P 因子の性質	11
1-6. 研究の目的と概要	14

2. 実験材料と方法

2-1. ファージと菌株	19
2-2. 培地	21
2-3. ファージの調製と精製	23
2-4. ファージの平板効力率 (E.O.P.) の測定	23
2-5. nit 変異株の分離	24
2-6. 接合実験	25
2-7. Pl _{vir} ファージによる形質導入	25
2-8. λ ptp ファージ感染後の Anthranilate synthetase の測定	25

3. 実験結果

	頁
3-1. P2 ϕ -ジ干渉(Spi)現象	27
3-2. nit 変異株の分離	29
3-3. nitA 変異の確認	30
3-4. nitA 変異株における λ P2-ジ右オペロンの N 蛋白 に依存しない初期遺伝子発現の測定	33
3-5. λ P2-ジ右オペロンの初期遺伝子の発現に対 する nitA 変異の影響	38
3-6. nitA 変異の大腸菌染色体上における位置	41
3-7. 高温致死性 nitA 変異株の分離	44
3-8. 高温致死性 nitA 変異の確認	47
3-9. 高温致死性 nitA 変異株における 転写終結の異常	50

4. 考察

4-1. nitA(ts ⁺) 変異株の遺伝学的解析	55
4-2. nitA(ts ⁺) 変異株の生化学的解析	57
4-3. 高温致死性 nitA 変異株の遺伝学的解析	60
4-4. 高温致死性 nitA 変異株の p 因子の 生化学的解析	64

4-5, 転写終結のモデル — <i>nit</i> A 遺伝子と <i>suA</i> 遺伝子との関連	頁 66
4-6, 高温致死性 <i>nit</i> B 変異株の遺伝生化学的解析 と 結 語	74
謝 辞	177
文 献	78

* 本論文で使用する略語は次の通りである。

ASase ; アントラニル酸合成酵素,
ATP ; アデノシントリリン酸,
cAMP ; サイクリック アデノシンモリリン酸,
DNA ; デオキシリボ核酸,
E. O. P. ; 平板効率率,
gal ; ガラクトース*,
ilv ; イソロイシン-バリン*,
lac ; ラクトース*,
met ; メチオニン*,
m. o. i. ; 感染多重度,
mRNA ; メッセンジャー RNA,
nin ; *N*-independent,
nit ; *N*-independent transcription,
O ; オペレーター,
O_L ; *λ*73-ジの左オペロンのオペレーター,
O_R ; *λ*73-ジの右オペロンのオペレーター,
P ; プロモーター,
P_L ; *λ*73-ジの左オペロンのプロモーター,

P_R ; *λ*73-ジの右オペロンのプロモーター,
rif ; リファンピシン,
RNA ; リボ核酸,
spi ; sensitivity to P2 interference,
Su ; サプレッサー (表現型),
suA ; polarity suppressor,
sup ; サプレッサー (遺伝子型),
sus ; suppressor sensitive,
t ; ターミネーター,
t_L ; *λ*73-ジの左オペロンのターミネーター,
tof ; turn off,
tr₁, tr₂ ; *λ*73-ジの右オペロンのターミネーター,
trp ; トリプトファン*,
ts ; 温度感受性,

* 遺伝子の場合に用いた。

1. 序 論

1-1. 大腸菌におけるRNA合成開始の制御機構

微生物の遺伝情報の発現とその調節機構を統一的に説明するモデルとして、1961年 Jacob & Monod は オペロン説を提唱した。⁽¹⁾⁽²⁾ このモデルはラクトース利用の適応性を司る大腸菌酵素β-ガラクトシダーゼの誘導産生機構と、大腸菌を宿主とするファージ入の溶原化-誘発とに関する彼等の数多くの遺伝学的、生化学的知見を実証的背景とし、広く形質発現調節の基本様式を予見したものである。彼等はここで新しくDNA上に「遺伝情報発現とその調節単位」を設定し、これを「オペロン」と名付けた(図1)。情報伝達の経路に関して、彼等は 大腸菌⁽³⁾ や ファージ感染系⁽⁴⁾ において当時ようやくその実体が把握されつつあったメッセンジャーRNA(mRNA)

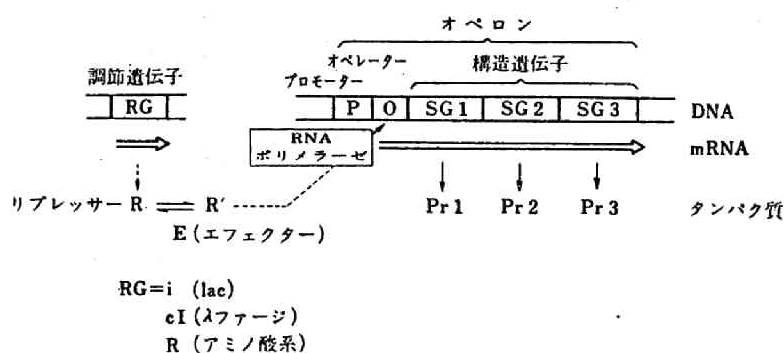


図1. オペロンの一般的な模式図

・ i, cI, および R は各オペロンのリプレッサーの遺伝子名を表わしている。

をオペロン説に導入し、形質発現の制御はそれぞれのオペロンに固有の mRNA 合成の調節によるものであることを示唆した。オペロン説はその後多くの実験系において検討され、数々の付加的修正（例えばアラビースオペロンにおける正（ポジブ）の調節遺伝子 *araC* の存在⁽⁵⁾）や確認（オペロンをなす DNA の意味のある鎖（sense strand）より、ポリシストロニック mRNA の合成⁽⁶⁾等）が加えられたとはいえ、基本的にモデルの正しさが実証され今日に至っている。

オペロン説によるとオペロンに属する構造遺伝子群の発現はその先端に位置するプロモーター、オペレーター部位で調節される。プロモーターは、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼが特異的に認識結合し転写を開始する部位であり、オペレーターは個々のオペロンに固有の調節遺伝子が産生するリプレッサーの作用点である（図 1）。リプレッサーがオペレーターに結合すると、立体障害の結果 RNA ポリメラーゼはプロモーターに結合できない⁽⁷⁾が、または結合しても RNA 鎖の伸長反応が阻止され⁽⁸⁾、構造遺伝子の発現が抑制される。一方リプレッサーの機能は、特異的な低分子リガンドにより不活化あるいは活性化される。これらのリガンドは従来、誘導物質（例えば

ラクトース(lac)オペロンにおけるIPTG^(*),あるいは抑制物質(例えばトリプトファン(trp)オペロンにおけるトリプトファン)として知られてきたものである。最近ではプロモーターやオペレーターDNAが lac 系⁽⁹⁾や λ ファージ系⁽¹⁰⁾などにおいて単離され,そのDNA構造の共通性,および特異性が塩基配列の研究を通じて検討されている。

上述のように オペロン説では,遺伝形質発現は特にRNA合成開始の段階で制御されるという点で特徴的であった。このような観点から,転写開始の調節に関与する蛋白因子の研究は飛躍的に発展した。これはRNAポリメラーゼ自身の研究とRNAポリメラーゼによる転写開始を調節する因子の研究とに大別される。大腸菌の大部分のRNA合成を触媒する酵素 DNA依存RNAポリメラーゼは分子量約50万で,少なくとも5つのサブユニット $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ からなる⁽¹¹⁾。このうち σ サブユニットは転写の開始段階でのみ機能し,プロモーターの特異的認識,結合に必要な因子と推定されている⁽¹²⁾⁽¹³⁾。また β サブユニットは実際に生体内でRNA合成の開始⁽¹⁴⁾のみならず,伸長⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾にも直接に関与していることが遺伝生化学的解析により明らかにされている。転写開始を正に調節する因子として,

(*) IPTG: イソプロピル- β -D-チオガラクトシド

糖 酵 酵 オペロン (lac オペロン, gal オペロン など) に特異的な
 CAP (catabolite gene activator protein) 蛋白があり, 遺伝学的に
 も同定されている⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾。CAP 蛋白は cAMP が存在すると, RNA ポリ
 メラーゼの糖 酵 酵 オペロンのプロモーターへの認識, 結合を促進する⁽⁸⁾。
⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾ 一方 転写の開始を負 (ネガティブ) に調節する リプレッサー
 蛋白に関する知見は, 遺伝学的解析と相まって著しく進んでいる。
 単離されたリプレッサーとして lac オペロンのリプレッサー⁽¹⁸⁾, gal
 オペロンのリプレッサー⁽¹⁹⁾, λファージの CI リプレッサー⁽²⁰⁾ などがある。
 これらの蛋白は *in vitro* RNA 合成系でそれぞれのオペロンの
 RNA 合成を特異的に抑制する⁽⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾。また アラビノース (ara) オ
 ペロンのリプレッサーである ara C 蛋白⁽⁵⁾ は, 同時に正の調節を
 行う アクティベーターとしての機能も有している⁽²²⁾。これらとは別に,
 生化学的研究より 転写の開始を促進する因子 ($M^{(23)}$, $H^{(24)}$, $L^{(25)}$, $D^{(26)}$
 蛋白など) について多くの報告がなされているが, いずれも主体内にお
 ける機能との対応は明らかでない。

このように 転写の開始に関する研究は 調節因子の単離,
in vitro RNA 合成系における 調節効果の検討, 遺伝学的な

解析の三者がそれぞれ平行して進んできた。転写開始の調節に関する完全な分子機構の解明も近い将来達成されるものと考えられる。

1-2. オペロンの非保存性

遺伝子の形質発現とその調節単位として定義されたオペロンは、転写の開始 伸長 終結に至る全課程を完結する単位であることを前提としている⁽¹⁾⁽²⁾。ところがオペロン説の付加的な観念上の修正として、オペロンは常に独立したものではなく、先行する他のオペロンの存在様式、すなわちプロモーター直前まで転写方向(5'→3' mRNA合成)を同じくする上流転

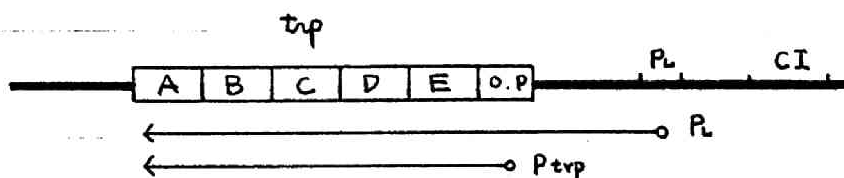


図2a, $\phi 80$ *ptrp* 190 マージ DNA 中のトリプトファンオペロン⁽²⁷⁾

図2 融合オペロン

—— : $\phi 80$ DNA を表わす
 □ : 大腸菌由来のトリプトファンオペロンのDNAを表わす。遺伝子名に関しては、文献(66)(74)参照。

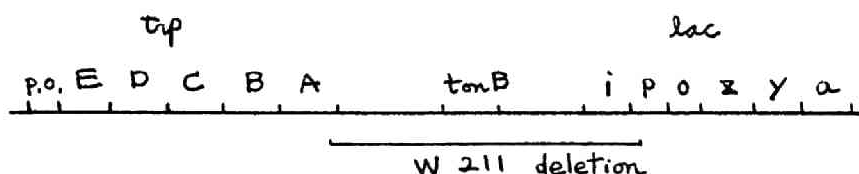


図2b, トリプトファン、ラクトースの融合オペロン⁽²⁸⁾

- W211: *trp* Aの後端から *lac* Pの前端まで欠損した変異株。遺伝子名に関しては文献(66)参照。

写のある場合が検討されてきた。形質導入 $\phi 80 p_{trp} 190$ (図2a, 前ページ) では、大腸菌の trp オペロンが $\phi 80$ λ -ジの P_L プロモーターより転写される左オペロン領域に組み込まれている。 $\phi 80 p_{trp} 190$ λ -ジにおける trp オペロンの発現を調べると⁽²⁷⁾, $\phi 80$ λ -ジの P_L プロモーターから開始する上流転写がない場合には, trp オペロンは独立のオペロンとして振舞い, その転写は P_{trp} プロモーターから開始し, 且つトリプトファン濃度に依存する trp オペロン固有の調節を受ける。これに反し λ -ジの転写系が働いているときには, P_L プロモーターから開始した転写が trp オペロンにまで継続転写 (read through) する。すなわち高濃度トリプトファンにより活性化されたトリプトファンリプレッサーはこの継続転写を終結できない。この場合 trp オペロンは, あたかも λ -ジの P_L プロモーターを先頭とする左オペロンの一構成員であるかの如く行動する⁽²⁷⁾。同様の現象は, trp , lac の2つのオペロンを融合させた系 (図2b) でも観察されている⁽²⁵⁾。この融合系では, 高濃度トリプトワンの存在が先行する trp オペロンの発現を抑制している場合には, lac オペロンは完全に独立のオペロンとして調節される, 一方トリプトファンが存在せず trp オペロンの発現が見られる場合には, lac オペロンはそのプロモーター, オペレーターを保有するにも拘らず lac オペ

ロン固有の調節は不完全になる⁽²⁸⁾。

以上の事実は、あるオペロンのプロモーター、あるいはオペレーターが必ずしも上流からの転写の終結を行うに十分な装置ではなく、オペロンの独立性は近傍に先行する転写の終結と密接な関係にあることを示唆している。すなわち オペロン単位の確立のためには転写の開始のみならず、上流の転写の終結における厳密な調節が重要であるものと考えられる。

転写の終結、およびその調節の機構に関する研究は 転写の開始に関する研究に比べあまり進んでいない、ただ *in vitro* 転写系において転写終結に関与する調節蛋白として ρ 因子が知られている⁽²⁹⁾。種々の DNA を鋳型とした *in vitro* RNA 合成系に ρ 因子が存在すると、分子量の低い RNA の生成が観察される⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾ (詳細は 1-5 にて後述)。したがって 核酸の転写終結塩基配列を ρ 因子が認識し、結果的に RNA ポリメラーゼの伸長が阻止されて転写が終結するものと推定されている。 ρ 因子が実際に生体内で機能しているかどうかという問題を はじめ、転写終結における RNA ポリメラーゼの役割、転写終結塩基配列の特異性、さらには終結に関

与する未知の因子の追及など、転写の終結、およびその調節機構については未だ明らかにされていない問題が多い。

1-3, 入フェージの転写調節

大腸菌の転写調節機構を明らかにするための手段として、本研究では入フェージ感染系を利用した。このため近年分子レベルでの研究が急速に深まりつつある入フェージの転写調節に関する知見について、特に感染初期において正の調節因子として機能する N 蛋白の働きを中心に、その重要点を述べる。

大腸菌を宿主とするテンプレートフェージ λ は分子量、約

3.1×10^7 ダルトン⁽³¹⁾ の二本鎖 DNA をゲノムとし、約 40 からなる

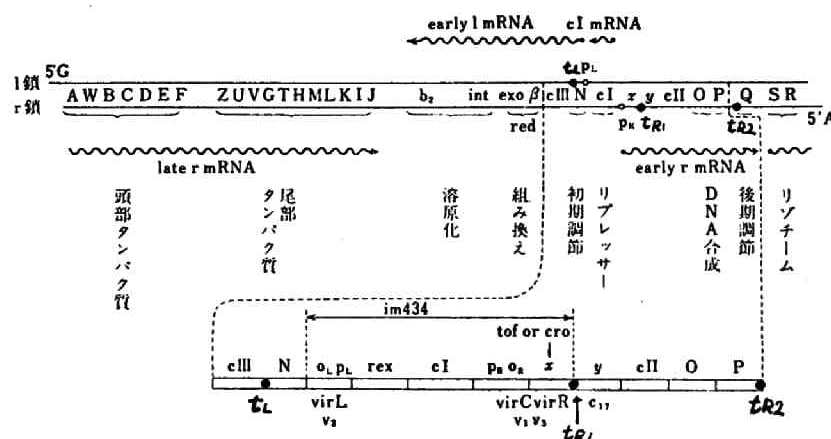


図 3. 増殖型入フェージの遺伝子地図

・ は転写終結点を表す。

遺伝子名などの詳細については本文、並びに文献 (72)(73)(74) を参照。

遺伝子のほとんどは既に解明されている⁽¹⁷²⁾⁽¹⁷³⁾⁽¹⁷⁴⁾ (図3, 前ページ)。

入ゲージの転写は2つのプロモーター P_L , P_R よりそれぞれ左方向, および右方向に開始されることが知られている。本論文では, これらのプロ

モーターより開始される転写領域をそれぞれ左オペロン, 右オペロンと呼ぶ。入ゲージ感染後, まず左オペロンでは初期調節遺伝子

N が, 右オペロンでは CI リプレッサーの合成, または機能を調節する

遺伝子 tof (cro , または λ 領域とも呼ばれる) が転写され, それぞれ転写終結点である t_L , おおむ t_R で転写は終結する⁽²⁹⁾⁽⁴⁰⁾ (図3,

図4 p.12, 図5 p.34.)。続いて N 蛋白が生産されると, その働きに

より左右両オペロンの転写は t_L , t_R で終結することなく継続

して下流の遺伝子群にまで進み⁽³²⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾⁽⁴⁰⁾ (read through), 左オペロ

ンの場合 $CIII - att$ 領域⁽³⁵⁾, 右オペロンの場合 $\phi - CII - P$ 領

域⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾ の遺伝子群が発現される (転写産物をそれぞれ $early$ と

$mRNA$, $early$ $r mRNA$ と呼ぶ)。すなわち N 蛋白は t_L , おおむ t_R

における転写終結を解除する抗終結因子 (antiterminator

としての機能をもち⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾, その作用機作は後述のように

P 因子の効果を阻止するものと想像されている⁽²⁹⁾。さらに右オペ

ロンの P-Q 遺伝子間には右方向転写の第2の終結点 t_{R2} が知られており、 ψ -CII-P 領域まで進んだ転写は再び N 蛋白の働きにより継続が可能となり、下流の Q 遺伝子が発現する。⁽³⁰⁾⁽⁴²⁾

Q 蛋白は後期遺伝子群(ファージ粒子の頭部、尾部蛋白など)の発現に必須の正の調節因子と考えられている。⁽⁴³⁾ Q 蛋白が生産されることにより、後期遺伝子は転写され⁽⁴⁴⁾(転写産物を late mRNA と呼ぶ)、ファージ粒子の構造蛋白が合成されてファージが成熟する。このように N 蛋白は t_L (N-CII 遺伝子間)、 t_{R1} (X- ψ 間)、 t_{R2} (P-Q 間) の3ヶ所にその作用点をもち、入ファージ感染初期の転写調節に重要な役割をになっている。

1-4. 入ファージの転写調節における宿主の関与

1-3 で述べた入ファージの転写とその調節にはファージゲノムの産物と同時に宿主大腸菌の主産する因子が大きく関与している。したがってその役割の解明は重要であるが、今のところ主に遺伝学的解析を中心に研究が進められている。

大腸菌の RNA ポリメラーゼの少なくとも β サブユニットはファージ感染後の

入ゲムの発現過程で、初期から後期に至るまで常に機能していることが必要とされている⁽⁴⁵⁾。また、入フェージの正常な転写を抑制することにより、フェージ増殖を抑える宿主変異株として、 $groN$ ⁽⁴⁶⁾、 ron ⁽⁴⁷⁾、 nus ⁽⁴⁸⁾などが分離されている。これらの変異株ではすべて入フェージ N 蛋白の機能が阻害され、転写終結点 (N 蛋白作用点) より下流の遺伝子群の発現が見られない。なお、 $groN$ 、および ron 変異株では RNA ポリメラーゼ β サブユニットの変化が報告されている⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾。これらの事実からフェージ N 蛋白が RNA ポリメラーゼと何らかの形で作用することにより、その機能を発揮していることを示している。 nus 変異は大腸菌染色体上で約 61~62 分 ($arg G$ と 90% 同時形質導入) に位置するが⁽⁴⁹⁾、 nus 遺伝子生産物と N 蛋白の相互作用の機構は未だ明らかでない。

1-5, ρ 因子の性質

本論文で述べる転写終結因子 ρ の変異株の分離は、入フェージ感染系を利用することにより行われた。 ρ 因子は元来、大腸菌の転写終結因子として 1969 年に Roberts により発

見され⁽²⁹⁾、次に述べるようにその生物学的意味づけが λ ゲノムの転写調節に関連してなされたものである。 λ DNA を鋳型とした *in vitro* RNA 合成系では、当然のことながら λ カージン蛋白は存在しない。この条件下で 左オペロンの転写を調べると、*in vivo* で λ SUSN⁻ を感染した際 観察されるような N 遺伝子に対応する短い RNA ができず、不均一な長い RNA が合成される。ところがこの *in vitro* RNA 合成系に ρ 因子を加えると λ DNA の転写は t_R 付近で終結され、*in vivo* と同様に N 遺伝子に対応する短い 12S RNA が合成される⁽²⁹⁾ (図4)。一方右オペロンの場合も ρ 因子存在下では t_R 付近で転写終結が見られ、*tof* 遺伝子(または λ 領域)に対応

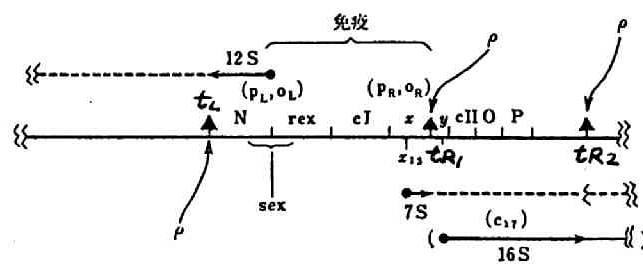


図4, λ カージン免疫領域付近の遺伝子地図
と *in vitro* RNA 合成のモデル⁽³⁰⁾
▲ は転写終結点を表わす。

ある短い 7S RNA が合成される⁽²⁹⁾ (図4)。同様のことは tR_2 についても見られ、 p 因子は入ゲムの転写を tR_2 付近で終結させることができる⁽³⁰⁾ (図4)。in vivo の実験より tL , tR_1 , tR_2 はいずれも N 蛋白の作用部位と考えられているので、1-3 で述べたように p 因子で終結される転写は、 N 蛋白が p と拮抗することにより継続されるという、いわゆる "antitermination model" が提唱された⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾ (p : terminator, N : antiterminator)。

p 因子は分子量 20 万 (沈降定数 8~9 S) で均一なサブユニット (分子量 5 万) からなるテトラマー蛋白である⁽²⁹⁾。 p 因子は大腸菌 (trp オペロン⁽⁵⁰⁾, lac オペロン⁽⁵¹⁾, gal オペロン⁽⁵¹⁾ など) や、 T_4 ⁽⁵²⁾, T_7 ⁽⁵³⁾, $\phi 80$ ⁽⁵⁴⁾, $\phi \lambda$ ⁽⁵⁴⁾ フォージなどの DNA を金型とする in vitro RNA 合成系でも転写終結効果をしめす。しかし いずれの場合も 高塩濃度の条件下では、終結効果と同時に核酸結合能も低下する。さらに最近 p 因子は RNA 依存 ATPase 活性も保持していることが明らかにされた⁽⁵⁵⁾。この RNA 依存 ATPase 活性が阻止されると、 p 因子による転写終結効果が同時に失われる⁽⁷⁵⁾。

1-6. 研究の目的と概要

大腸菌の転写調節機構に関する研究, 特に転写一般に共通して働く因子(リプレッサーやCAP蛋白など特殊なオペロンにのみ作用する因子を除く)の解析は従来, まづ生化学的手法により大腸菌の粗抽出液から単離精製し, その性質を詳細に調べるといった方法が一般的であった。このようにして RNA ポリメラーゼ, σ , $\sigma^{(56)}$, P , $Pr^{(57)}$, $M^{(23)}$, $H^{(24)}$, $L^{(25)}$ などの蛋白が転写調節に関与する因子として報告されて来た。しかしながらこれらの蛋白のなかで変異株が分離されることにより, 実際に生体内における役割との対応が明確にされているのは RNA ポリメラーゼの β サブユニット⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ (rif 遺伝子)のみであり, 他の蛋白については生化学的手法で想定されるそれぞれの機能が, 実際に生体内でも同様に発揮されているかどうか疑問が残されている。すなわちある機能の生体外における関係を明確にするためには, 生化学的解析と遺伝学的研究手段と組合せることがもっとも適した方法と考えられる。そこで筆者は, 転写の開始, 伸長, および終結の各段階の調節に直接に関与する因子の変異株を分

離し、これらの遺伝変異と生化学的手法で見出だされた調節蛋白(例えば上記の各蛋白)との対応関係を検討することにより、大腸菌の生体内における転写調節の機構を明らかにすることを意図した。

大腸菌の転写調節に関与する因子の変異株を分離する手段として 1-3 で述べたように、宿主依存度が高く且つ転写調節機構の詳細な解析が進められている入フージ感染系を利用することにした。すなわち大腸菌の転写因子の機能の変化が入フージの転写にも影響をおよぼし、その結果感染フージの増殖が抑制される(換言すると大腸菌はフージ抵抗性となる)表現型を目安にすれば、宿主変異を選別することができる。具体的方法は、以下の2つの原理から成り立っている。(A) 野生型入フージは P2 フージが溶原化した大腸菌では増殖できない。⁽⁵⁸⁾ P2 フージによるこの干渉は Spi (sensitivity to P2 interference) 現象と呼ばれており、干渉成立には P2 フージの *old* 遺伝子と入フージの左オペロンに位置する γ , β , *exo*, δ の4つの遺伝子(併せて, spi 遺伝子群と呼ばれる。図5 p.34)の発現が必要である。⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾⁽⁶¹⁾

したがって P2 フージニ容原菌は野生型入フージに

対し 抵抗性^(*)をしめすが, spi 遺伝子群も欠失した入子
 ズ (例えば $\lambda_{\text{ptp60-3}}$, 図5 p.34) に対しては感受性である。

(B) spi 遺伝子群は tr より下流に位置するので, その発現は
 完全に N 蛋白に依存する (1-3 参照)。 $\lambda_{\text{susN7 min5}}^{(62)(63)}$
 は N 遺伝子にアンバー変異が生じ正常な N 蛋白を生産しない (但し
 この子では tr2 が min5 変異により欠失しているため⁽⁶⁴⁾, spi 遺伝子が
 部分的に発現されるので アンバー サプレッサー をもたない宿主
 菌 (Su^-) でも増殖は可能である) ので, 左オペロンの III-att
 領域が転写されず, したがって spi 遺伝子群は発現しない。
 この結果, $\lambda_{\text{susN7 min5}}$ は P2 子菌でも増殖可能
 である。いかえると 宿主 P2 子菌 (Su^-) は $\lambda_{\text{susN7 min5}}$
 に対し感受性をしめす。

そこで 突然変異誘起剤で処理するこにより, P2
 子菌 (Su^-) から $\lambda_{\text{susN7 min5}}$ に対し 抵抗性^(*)をしめ
 す 宿主変異株を選べば, 子菌 N 蛋白がなくても spi 遺伝子群の発
 現が見られる変異株, すなわち N 蛋白に依存しないで入子 III-att

(*) 2-5 p.24 脚注 参照。

領域の転写を行える宿主変異株を、選択的に分離できる可能性
 がある。本論文では、このような変異株を *nit* (*N*-independent
transcription, *N*非依存性転写) 変異株と呼ぶ。*nit* 変異株には次のような性
 質の変化が期待される。(1) 転写の開始に関与する因子
 (例えば RNA ポリメラーゼや σ 因子など) が変異したために、通
 常行われない転写開始が上より下流で起り, *spi* 遺伝子群
 の発現が可能になる (2) 転写の終結に関与する因子 (例え
 ば RNA ポリメラーゼや ρ 因子など) が変異したために、転写は上
 で終結できずに継続 (*read through*) する結果, *spi* 遺
 伝子群の発現が可能になる。

実際 筆者は多くの *nit* 変異株を分離したが、現
 在までに同定、解析の進んでいる 2 群, *nit* A, および *nit* B 変
 異株については上述 (2) の可能性が実証できた。すなわち 以
 下に述べるように *nit* A 遺伝子が *E. coli* 転写終結因子 ρ の構
 造遺伝子であり, ρ 因子による正常な転写終結が *E. coli* の
 増殖に必要な素過程の一つであることが明らかになった。
 一方 本論文の主題ではないが, *nit* B 変異 (高温致死性) は

RNA ポリメラーゼの β サブユニットの構造遺伝子 rif に非常に近接して位置し、実際 $mitB$ 株の RNA ポリメラーゼは転写終結機能に欠損をもつことが判明した。これらの事実は、生体内の転写終結における ρ 因子の関与を明らかにするとともに、RNA ポリメラーゼとの相互作用を示唆している。

2. 実験材料と方法

2-1. ファージと菌株

本研究に用いたファージは表1に示した。 λ *susN7nin5*, または λ *susN7N53nin5* は λ i434 *susN7nin5* と λ *susN7*, または λ *susN7N53* との組み換えファージより分離した。 λ *susN7nin5spi* は, λ *susN7nin5* 溶原菌より紫外線誘発して得た溶菌液をアンバーサプレッサーをもつ P2 ファージ溶原菌 KY363 (P2) 上にプレートすることにより, 分離した。このファージの P2 溶原菌で増殖できるという性質 (*Spi*⁻) は, 野生型 λ ファージに対し劣性をしめすので, *spi* 遺伝子群 (γ , ϵ , β , δ) の欠失ファージであろうと考えられる⁽⁵⁹⁾。

表 1. ファージ株

Phage	Source and/or reference	
<u>λ i434 <i>susN7nin5</i></u>	K. Matsubara	Court and Sato (1969) ⁽⁶²⁾
<u>λ <i>susN7nin5</i></u>	this work	
<u>λ <i>susN7nin5spi</i></u>	this work	
<u>λ <i>susN7N53nin5</i></u>	this work	
<u>λ <i>pbio11</i></u>	laboratory stock	Zissler et al. (1971) ⁽⁶⁰⁾
<u>λ <i>ptrp60-3</i></u>	A. Matsushiro	Inoko and Imai (1974) ⁽⁷⁸⁾
<u>λ <i>susN7N53ptrp46</i></u>	N. C. Franklin	
<u>λ CI857 <i>susN7N53</i></u>	Y. Takeda	
<u>λ CI857 <i>susN53sus029susP3</i></u>	H. Uchida	
<u>λ CI857 <i>susN7N53byp</i></u>	D. I. Friedman	Butler and Echols (1970) ⁽⁶⁵⁾
P2	H. Yamagishi	
Plvir	laboratory stock	

用いた菌株はすべて大腸菌 K12 株由来で、その遺伝的性質を
表 2 にしめた。

表 2, 菌株

菌株	遺伝的性質	由来
KY 363	F ⁻ lac, suII.	HfrH x C600, H. Ozeki
W 3350	F ⁻ gal1, gal2, lac.	H. Ozeki
KY 817	F ⁺ trpE	
KY 4710	F ⁻ thr tonB-trp deletion his thy str	derived from KY817 through several steps
W 3350(P2)	F ⁻ gal1 gal2 lac (P2)	W 3350
KY 363(P2)	F ⁻ lac suII (P2)	KY 363
KY 4727	F ⁻ thr tonB-trp deletion his thy str (P2)	KY 4710
KY 4737	Hfr pro trpE (P2), gene sequence of transfer: origin - str - arg - thr - trp	derived from KY817 through several steps
KY 4738	Hfr pro trpE (P2), gene sequence of transfer: origin - trp - his - str - arg	derived from KY817 through several steps
KY 4742	F ⁻ thr tonB-trp deletion his thy metE str (P2)	KH39 — X HD12
KY 4744	F ⁻ thr tonB-trp deletion his thy ilv str	KY 4710
KY 4745	F ⁻ thr tonB-trp deletion his thy metE str	KH39 — X KY4744
KY 4754	F14 pro trp ilvD metE str recA	AB1206
KY 4757	F ⁻ thr trpE his thy str (P2)	KY817 — X KY4727
KY 4792	F ⁻ thr trpE9829(am) his tyr(am) thy ilv metE sup126 (P2)	KH54
KY 8022	F16 proA his ilvC argE thi	T. Miki
HD1	F ⁻ nitA6 other markers same as in KY4727	KY4727
HD6	F ⁻ nitA16 other markers same as in KY4727	KY 4727
HD7	F ⁻ nitA18 ilv(leaky) other markers same as in KY4727	KY 4727
HD10	F ⁻ nitA6 ilv other markers same as in KY4727	HD1
HD12	F ⁻ nitA18 ilv other markers same as in KY4727	HD7
HD15	F ⁻ nitA18 thr trpE his thy ilv(leaky) str (P2)	KY817 — X HD7
HD16	F ⁻ nitA6 thr tonB-trp deletion his thy str	HD1 — X KY4744
HD19	F ⁻ nitA16 thr tonB-trp deletion his thy str	HD6 — X KY4744

表 2 (続き) 菌 株

菌 株	遺 伝 的 性 質	由 来
HD 21	F ⁻ nitA18 thr tonB-trp deletion his thy ilv (leaky) str	HD7 —X KY4745
HD 33	F ⁻ nitA18 thr trpE his thy ilv (leaky) str	KY817 —X HD21
HD 43	F ⁻ nitA18 thr trpE his thy ilv (leaky) str (λ susN ₁ N ₅₃)	HD33
HD 136	F ⁻ nitA112 thr trpE9829(am) his tyr(am) thy metE sup126 (P2)	KY4792
HD 138	F ⁻ nitA702 thr trpE9829(am) his tyr(am) thy metE sup126 (P2)	KY4792
HD 149	F ⁻ nitA112 thr trpE9829(am) his tyr(am) thy sup126	KN250 —X HD136
HD 152	F ⁻ nitA702 thr trpE9829(am) his tyr(am) thy sup126	KN250 —X HD138
KH 39	F ⁻ thr trpE his tyr thy metE sup126	T. Horiuchi ⁽⁷⁶⁾
KH 50	KHF50 pro trp ilv metE str recA	T. Horiuchi ⁽⁷⁶⁾
KH 54	F ⁻ thr trpE9829(am) his tyr(am) thy ilv metE sup126	T. Horiuchi ⁽⁷⁶⁾
KN250	F ⁻ thr trpE9829(am) his tyr(am) thy ilv sup126	T. Nagata ⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾
AB1206	FH4 pro his ilv-argH deletion thi str	E. Adelberg

- ・ 遺伝子名 nit (N-independent transcription) に関しては本論文 参照。
- ・ am は アミナー変異を表す。
- ・ 他の遺伝子名に関しては、文献 (66) 参照。
- ・ Plasmid による形質導入は 供与菌 —X 受容菌で表わした。

2-2. 培 地

最少培地として、Vogel & Bonner (1956) の medium E⁽⁶⁷⁾ に 0.5% グルコースを加えたものを用いた。EA 培地は medium E に 0.5% グルコースと 0.2% カザアミド酸 (Difco 社) を、EAT 培地はさらに 50 μ g/ml の L-トリプトファンを添加した培地である。トリプト

ン培地は 1ℓ 中に 20g のポリペプトン (和光純薬), 5g の食塩を含み, 1N NaOH で pH 7.2 に調整した。液体培地として用いる場合は, さらに 0.5% グルコースを加えた。これらの培地を固型培地として用いる場合は, すべて 1.5% の寒天を添加した。また, 上層半寒天培地として用いる場合には, 入培地 (後述) は 0.5%, その他の培地は 0.75% の寒天を添加した。チミンを要求する菌株を生育する場合には, 50 $\mu\text{g/ml}$ のチミンを加えた。接合実験に用いる供与菌および受容菌の増殖には penassay 培地を用いた。入培地は 1ℓ あたり 10g ポリペプトン, 2.5g の食塩を含み, 1N NaOH で pH 7.0 に調整したもので, 入マージの増殖に用いた。L 培地 (Lennox⁽⁶⁸⁾) は主として P2, P1 マージの増殖に使用した。EMB 寒天培地として Lederberg の培地⁽⁶⁹⁾を用い, 主に入マージの cross streak テストに使用した。マージ吸着バッファーは 1ℓ あたり 0.01M Tris HCl バッファー pH 7.4, 0.15g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.08g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01g のゼラチンを含む。入マージの場合には, さらに 0.01 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加した。

2-3. ファージの調製と精製

ファージは適当な感染多重度 (multiplicity of infection: m.o.i.) で感染し、寡天または液体培地で殖やあか、溶原菌を紫外線誘発後、液体培地で培養することにより調製した。なお、入ファージには入培地またはペプトン培地を、P1 P2 ファージには L 培地を、その他のファージにはペプトン培地をそれぞれ用いた。ファージ溶菌液は食塩 - ポリエチレングリコールにより⁽⁷⁰⁾濃縮後、CsCl 密度平衡遠心法で精製した。

2-4. ファージの平板効率 (E.O.P.) の測定

ファージ吸着バッファーで懸濁した菌に適当な m.o.i. でファージ溶菌液を加え、37°C 15~20分静置し吸着させる。その後入ファージの場合には入上層半寡天培地 3 ml を混合し、直ちにペプトン寡天培地上に広げる。P1, P2 ファージの場合には上層半寡天培地 および 寡天培地 とともに L 培地を、その他のファージの場合には、ともに ペプトン培地 を使用した。培養は一般に 37°C で 1 晩行った。

2-5, nit 変異株 の分離

nit (*N*-independent transcription) 変異株は, P2 フージを溶原化したアンバー サプレッサーをもたない大腸菌株, KY4727 より分離した。対数増殖期の菌を 0.2 M 酢酸ナトリウムバッファー pH 7.0 に懸濁し, 700 µg/ml の *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine で 37°C 45 分処理 (このとき生存菌は 10 ~ 25%) 後, 直ちに遠心により 2 回 洗滌し, ペプトン液体培地で 37°C 1 晩培養する。培養液を適当に希釈後, ペプトン寡天培地に塗布し, 37°C 1 晩培養する。生じたコロニーは, あらかじめ λ SUS η min5 手印は λ SUS η min5 spi を塗布した EMB 寡天培地 2 枚にレプリカする。 λ SUS η min5 に 抵抗性^(*)をしめし, λ SUS η min5 spi には感受性をしめすコロニーを分離し, さらに EMB-寡天培地上の cross streak 法で, この性質を確認する。

(*) 抵抗性: この論文では, "抵抗性" という言葉の定義は, 例えば cross streak 法で, 明らかに溶菌しないという意味で用いている。すなわち, P2 溶原菌に入フージ感染後, 50 ~ 10% の細胞は生存される⁽⁵⁹⁾。しかし, 同時に入フージも増殖できないため, 例えば cross streak 法で細胞の溶菌はみられない。したがって本論文では通常用いられる 'フージ抵抗性' (フージが存在しても, 菌は正常な増殖をしめす) と同じ意味が異なるので注意を要する。

2-6. 接合実験

供与菌 (Donor cells) を $5 \times 10^8/\text{ml}$, 受容菌 (Recipient cells) を $1 \times 10^9/\text{ml}$ まで penassay 培地で培養後, 供与菌と受容菌を 1:5~10 の比で混合し, 滅菌したマヤー フラスコを用い 37°C で適当な時間静置する。1~2回洗菌後, 適当な選択寡糖培地に塗布する。 37°C で2~3日培養する。

2-7. Pl vir ファージによる形質導入

ペプトン培地で1晩培養した受容菌 (約 2×10^9 cells) を遠心後, ファージ吸着バッファーに懸濁する。Pl vir ファージを $\text{m.o.i.} = 0.2 \sim 0.5$ で加え, 37°C 20分静置し, 吸着させる。遠心後, 必要があれば洗菌を繰り返す, 適当な選択寡糖培地に塗布する。その後一般には 37°C 2~3日培養する。

2-8. λptp ファージ感染後の Anthranilate synthetase 合成の測定

菌は EAT 培地またはペプトン培地で 37°C で $2 \times 10^9/\text{ml}$ まで振盪培養する。遠心後, トリプトファン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む吸着バッファーに懸濁する。 λptp ファージを $\text{m.o.i.} = 1 \sim 10$ になるように加え

し、 37°C 20分静置し吸着させる。未吸着ファージを遠心により除き、あらかじめ 37°C で保温したEAT培地に懸濁する。直ちに 37°C で振盪を開始し、適当な時期に適当量を採取する。急速に氷冷するとともに $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを加え、反応を停止させる。続いて $100\mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコールを含む 0.05M Tris HCl バッファー (pH 7.8) を用い低温で一度洗浄した後、同じバッファーに懸濁する。さらにトルエンを一滴加え、 37°C 15分振盪する。このトルエン処理した各試料菌液について、Anthranilate synthetase (ASaseと略す。trp オペロンのE, D遺伝子生産物の会合蛋白) 活性を測定する。

ASase 活性の測定は Gibson & Gibson (1964)⁽⁷¹⁾ の変法を用いた。反応液は 0.5ml 中に 50mM Tris HCl pH 8.2, 5mM MgCl_2 , 0.5mM L-グルタミン, 0.5mM エリスミン酸を含む。反応液にトルエン処理した適当量の糸細胞懸濁液を加え、 37°C 20分反応させる。 1N HCl 0.05ml を加えて反応を停止し、生成したアントラニル酸を酢酸エチル 4ml で抽出し、蛍光光度計によりアントラニル酸を定量する。 37°C 20分間に $0.1\mu\text{mole}$ のアントラニル酸を生成させる ASase を "1 unit" と定義する。

3 実験結果

3-1, P2⁺3⁻ジ干涉 (spi) 現象

P2⁺3⁻ジが溶原化した大腸菌では野生型 λ 3⁺ジの成長が抑制される (spi (sensitivity to P2 interference) 現象⁽⁵⁸⁾) 結果, P2 溶原菌は λ 3⁺ジに対し抵抗性^(*)をしめることが知られている。この spi 現象が成立するためには, P2⁺3⁻ジの old 遺伝子と λ 3⁺ジの spi 遺伝子群の発現が必要であることが明らかにされている⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾⁽⁶¹⁾ (1-6, 参照)。一方 変異型 λ svsN η nin5 は nin5 欠失変異によりその増殖に正常な N 蛋白を必要としない⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾が, 左オペロンの CII-att 領域は N 蛋白がないため転写されず, したがって spi 遺伝子群の発現が見られないと考えられる (1-3, 1-6, 参照)。実験の結果, 1-6 で予測したように, λ svsN η nin5 は アンバーカプレッサーをもたない P2 溶原菌 W3350 (S⁺-P2) で増殖可能なことがわかった (表3)。対照としてカプレッサーをもつ P2 溶原菌 KY363 (S⁺II⁺-P2) を用いた場合, N 蛋白産生による spi 遺伝子群の発現のため, λ svsN η nin5 の増殖は抑えられる。したがって P2 溶原菌 KY363

(*) 2-5, P24 脚注参照。

は $\lambda_{susN7nin5}$ に対し 感受性を示した (表3)。 $\lambda_{susN7N53nin5}$ についても全く同様の結果が得られた (表3)。

表3. $\lambda_{susN7nin5}$ フージの種々の大腸菌株における増殖,並びに平板効率

Phage Bacteria	$\lambda_{susN7nin5}$	$\lambda_{susN7N53nin5}$
W3350 (Su^-)	S (1.0)	S (1.0)
W3350 (Su^-P2)	S (0.70)	S (0.78)
KY363 ($SuII^+$)	S (1.0)	S (1.0)
KY363 ($SuII^+P2$)	R (1.5×10^{-5})	R (5.8×10^{-6})

- S, または R は EMB-D 寒天培地を用いた cross streak 法で, それぞれ 感受性, または 抵抗性 と判別された場合を表わす。
- カッコ内の数字はそれぞれのフージの各菌株における平板効率を表わす。方法については 2-4 参照。なお, すべて一夜培養後の菌を用いて実験を行った。平板効率は P2 非溶原菌を指示菌として使用した時得られる フージのカイ価 (titer) に対する, P2 溶原菌を用いた場合得られる フージのカイ価の比で表わした。

また spi 遺伝子群が欠失している $\lambda_{susN7nin5spi}$ では, P2 溶原菌のアンバ-サフレーターの有無に拘らず, フージの増殖は可能であった。(111)

以上の実験結果は, $\lambda_{susN7nin5}$ に感受性である KY4727

(S₀-P2)株より, λ_{susN_7min5} に抵抗性をしめす株を選べば, N蛋白がなくても λ ファージの初期転写を可能ならしめるような大腸菌の変異株 (nit 変異株) を選抜できる可能性をしめしている (1-6. 参照)。このような指針のもとに nit 変異株の分離を試みた。

3-2. nit 変異株の分離

アンバーサプレッサーをもたない P2ファージ溶原菌, KY4727 を N-methyl N'-nitro N-nitrosoguanidine 処理することにより, λ_{susN_7min5} に対し抵抗性をしめす nit 変異株を約 10^{-3} という高い頻度で多数分離した (2-6. nit 変異株の分離, 参照)。そのなかで, 遺伝学的性質から同一グループに属すると考えられる 3つの nit 変異株 (以後, nit A 変異株と呼ぶ), HD 1 (nit A 6), HD 6 (nit A 16), HD 7 (nit A 18) における λ_{susN_7min5} の平板効率を表 4 (次ページ) にしめた。nit A 6, nit A 18 変異株における λ_{susN_7min5} の平板効率は約 10^{-2} であり, $\lambda_{susN_7N_{53}min5}$ については平板効率はさらに低く, 変異株はより高い抵抗性を獲得していた。一方 λ_{susN_7min5} , $\lambda_{susN_7N_{53}min5}$ の nit A 16 変異株における平板効率はともに 0.25 であった。3つの nit A 変異株は 434 ファージ由来の PL プロ

モーターをもつ $\lambda i434_{susN7nin5}$ (図3) に対しても同様に、すべて拮抗性をしめた。これら3つの *nitA* 株の増殖については、調べた種々の培養条件 (高温, 低温, 最小培地, 栄養培地など) 下で、親株 KY4727 と顕著な差は見いだされなかった。

表4, *nitA* 変異株の各ファージに対する感受性, 並びに平板効率

Phage Bacteria	$\lambda_{susN7nin5}$	$\lambda_{susN7N53nin5}$	$\lambda i434_{susN7nin5}$
HD 1 (<u><i>nitA6</i></u>)	R (1.5×10^{-2})	R ($< 4 \times 10^{-4}$)	R
HD 6 (<u><i>nitA16</i></u>)	R (0.25)	R (0.25)	R
HD 7 (<u><i>nitA18</i></u>)	R (1.0×10^{-2})	R ($< 4 \times 10^{-5}$)	R
KY4727(<u><i>nitA</i>⁺</u>)	S (1.0)	S (1.0)	S

- 平板効率は、親株 KY4727 を指示菌として使用した時得られるファージのカイ価 (titer) に対する、各 *nitA* 変異株を用いた場合得られるファージのカイ価の比で表わした。
その他については表3の説明 参照。

3-3. *nitA* 変異の確認

nitA 変異株は $\lambda_{susN7nin5}$ に対し拮抗性をしめすが, *Spi* 遺伝子群を欠失したファージ $\lambda_{susN7nin5 spi}$, λ_{pbio11} , $\lambda_{ptp60-3}$ に対しては、親株 KY4727 とほぼ等しい感受性をしめし、平板効率

は ほぼ 1.0 に近い値であった (表5)。この結果は *nitA* 変異

表5. *nitA* 変異株 の 各 λ spi 73-ジ に対する感受性,並びに平版効率

Phage Bacteria	λ bio11	λ trp60-3	λ susN7nin5spi
HD 1 (<i>nitA6</i>)	S (1.02)	S (0.71)	S (1.14)
HD 6 (<i>nitA16</i>)	S (0.97)	S (1.26)	S (1.34)
HD 7 (<i>nitA18</i>)	S (0.71)	S (0.98)	S (1.04)
KY4727(<i>nitA</i> ⁺)	S (1.0)	S (1.0)	S (1.0)

・ 説明 については 表4 参照。

株 の λ susN7nin5 に対する抵抗性が 単に 73-ジ の 増殖抑制 によるものではなく, λ 73-ジ の CII - att 領域 に位置する spi 遺伝子群の発現に 帰因した, いわゆる spi 現象を通じて表われていることを示唆する。

この事実をさらに確認するために, spi 現象の 今1) の要因である P2 73-ジ を変異株 から除去することにより, 其の λ susN7nin5 抵抗性を検討した。通常 P2 溶原菌 からの P2 73-ジ の除去は困難であるため, P2 非溶原性 *nitA* 変異株の調製は, 並びに *nitA* 変異を P1nin 73-ジ により P2 非溶原性の親株 K1+K10

に再び導入することにより行った(3-6, 参照)。このおりにて調製した P2ファージをもたない *nitA* 変異株は $\lambda_{susN7nin5}$ に対する抵抗性を失い、親株とほぼ等しい感受性を示した(表6)。これらの P2非溶原性 *nitA* 変異株に再び P2ファージ

表6, P2非溶原性 *nitA* 変異株の各ファージに対する感受性, 並びに平板効率

Bacteria	Phage	$\lambda_{susN7nin5}$	λ^+
HD 16	(<u><i>nitA6</i></u> P2 ^S)	S (0.95)	S (1.08)
HD 19	(<u><i>nitA16</i></u> P2 ^S)	S (1.04)	S (1.36)
HD 21	(<u><i>nitA18</i></u> P2 ^S)	S (0.90)	S (1.39)
KY4710	(<u><i>nitA</i></u> ⁺ P2 ^S)	S (1.0)	S (1.0)

・ 説明については表4 参照。

を溶原化させると, $\lambda_{susN7nin5}$ に対する抵抗性が回復した。⁽¹¹⁾これらの結果は, *nitA* 変異株の $\lambda_{susN7nin5}$ に対する抵抗性の発現には, P2ファージ(おそらく *old* 遺伝子⁽⁶¹⁾)の存在を必要とすることを示している。すなわち, *nitA* 変異株では N 蛋白に依存せずに λ オペロンの CIII - *att* 領域の転写が可能であり, そのため *SpC* 遺伝子群が発現し, P2ファージの *old* 遺伝子生産物と協同して $\lambda_{susN7nin5}$ の増殖を抑えているものと考えられる。

一つの可能性として、これらの *nitA* 株は変異により新たにアンバー サプレッサー 活性を獲得し、 λ SVsN7min5 ファージの N7 アンバー変異を抑制 (suppression) する結果、*spi* 遺伝子群が発現しているということも考えられる。しかしながらいずれの *nitA* 変異株も、調べたすべての T4 ファージのアンバー変異や入ファージのアンバー変異を抑制することができない (野生型 T4 および入ファージは *nitA* 変異株において正常に増殖する。表 6 参照) ことがわかったので、そのような可能性は極めて低いと考えられる。

以上の試験の結果、*nitA* 変異株では確かに入ファージ左オペロンの N 蛋白に依存しない転写が可能であると考えられる。

3-4, *nitA* 変異株における入ファージ左オペロンの N 蛋白に依存しない初期遺伝子発現の測定

nitA 変異株で予測されてきた入ファージ左オペロンの CII-2 領域における N 非依存性転写を、直接 測る方法として、大腸菌の *trp* オペロンを組み込んだ形質導入ファージ λ ptp60-3 の入 *trp* N53ptp46 を用い、これらファージ感染後に合成されるアコラニル酸合成酵素 (ASase, *trpE* と *trpD* 遺伝子生産物の会合蛋白) 量をその活性により

測定した。 $\lambda_{ptp60-3}$ は *trp* オペロンの全体を, $\lambda_{susN_hN_{53}ptp46}$ では *trpE*, *trpD* 遺伝子を, それぞれ λ フージゲラムの CIII-*att* 領域にフージの転写と同方向に組みこんでいる (図5)。なお, $\lambda_{susN_hN_{53}ptp46}$

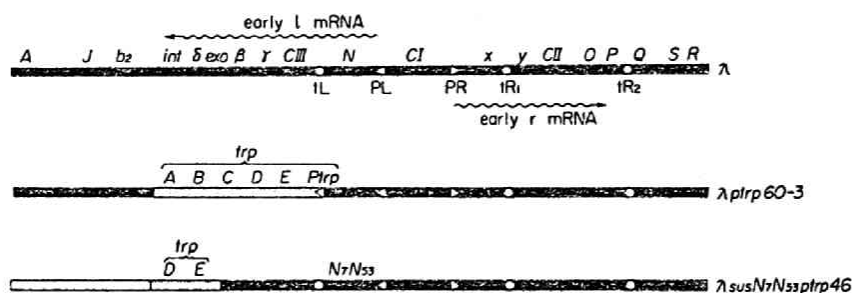


図5. $\lambda_{ptp60-3}$, $\lambda_{susN_hN_{53}ptp46}$ の遺伝子地図

- : λ DNA を表わす。
- - - - - : 大腸菌由来のトリプトファンオペロンの DNA を表わす。
- : $\phi 80$ DNA を表わす。
- ▷ : プロモーターを表わす。
- : ターミネーターを表わす。

遺伝子名は文献 (72) (73) (74) による。

は, 後期遺伝子群 (A-*att* 領域) が $\phi 50$ フージゲルに入る λ - $\phi 80$ 雑種 (hybrid) フージゲルである⁽⁷²⁾ (図5)。 $\lambda_{ptp60-3}$ フージゲルの全 *trp* オペロンの発現は, 培地に高濃度トリプトファンが存在する場合には λ フージゲルの P_{trp} プロモーターから開始する λ オペロンの転写に完全に依存する⁽⁷³⁾。一方 $\lambda_{susN_hN_{53}ptp46}$ フージゲルに組み込まれた *trpE*, *trpD* 遺伝子の発現は, このフージゲルが *trp* プロモーターとモーター

ため、培地中にトリプトファンが存在しないに拘らず、 λ ptpのP₂プロモーターから開始する
 なオペロンの転写に依存する。但しこの場合この λ ptpに *musN* *N₅₃* 変異が存在するため、
N の発現に必要な宿主アンバーサプレッサー変異の存在が必要にならない⁽⁴⁰⁾。

高濃度 トリプトファン 存在下における λ ptp₆₀₋₃ 感染後の *ASase* 合
 成量および合成速度については、*nitA*18 変異株とその親株 KY4727 の間で顕
 著な差は見いだされなかった (図 6)。 *ASase* 合成は λ ptp の *tof*

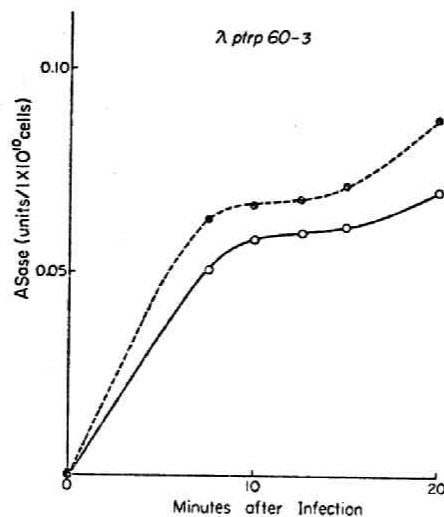


図 6, λ ptp₆₀₋₃ 感染後の *ASase* 合成

用いた菌株はトリプトファンオペロンが欠失している
 ので、観察される *ASase* 合成は λ ptp₆₀₋₃ λ ptp-3'ゲ
 ムの発現に由来している。方法については 2-8
 参照。なお, m.o.i. = 1 で実験を行った。

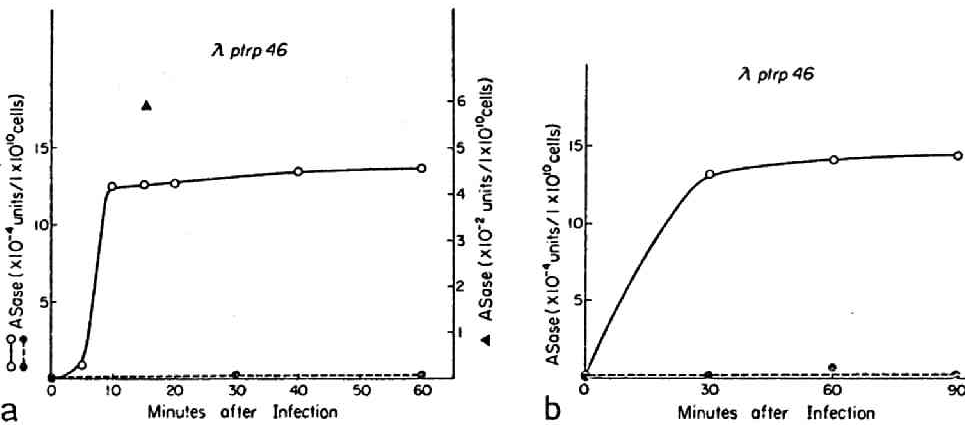
- — ○ : HD7 (*nitA*18)
- - - - ● : KY4727 (*nitA*⁺)

遺伝子の働きにより、感染後約8分で停止 (turn off)⁽⁷⁸⁾⁽⁷⁹⁾ するのが観察された。

全く同様の結果が *nitA6*, *nitA16* 変異株についても得られた。これらの事実は、*nitA* 変異株においても入マージ左オペロンの初期遺伝子の転写調節が正常に行われていることをしめしている。特に *入* の *tof* 遺伝子による turn off 現象が正常に見られることは、*nitA* 変異が turn off 制御に関与する宿主因子の変異 (*tof* 変異⁽⁷⁸⁾ や *tolIV* 変異⁽⁸⁰⁾) とは無関係であることをしめしている。

同様の実験を *入susN₇N₅₃ptp46* について、KY4727 由来の KY4757 (*tonB⁺*) 株を宿主として行った。ここで *tonB⁺* 株を用いたのは、*入susN₇N₅₃ptp46* の場合 *入* の尾部遺伝子が *φ80* マージ由来であるため、親株 KY4727 (*tonB* 遺伝子が欠失している) には吸着できないという技術的な理由からである。KY4757 株に *入susN₇N₅₃ptp46* を感染すると、*Asase* が検出されないため、感染60分後でも *Asase* 合成はほとんど検出されなかった (図7a)。これに対し *nitA18 tonB⁺* 変異株では、感染後10分までに有意と思われる *Asase* 合成が検出され、その後停止することがわかった⁽⁷⁹⁾ (図7a, 図7b)。ほぼ同様の結果が *nitA6*, *nitA16* 変異株についても得られた。これらの結果は溶原 *P273*-ジの有無に関係しなかった。*nitA* 変異におけ

図7. λ SusNnN53ptp46 感染後の ASase 合成



• 用いた菌株は *tpeE* 遺伝子に変異をもっているため、観察される ASase 合成は λ SusNnN53ptp46 フォージングの発現に由来している。方法については、2-8 参照。なお、m.o.i. = 5 で実験を行った。

- a. ○ — ○ : HD15 (nitA18 tpeE tonB⁺)
 ● — ● : KY4757 (nitA⁺ tpeE tonB⁺)
 ▲ : KY363 (nitA⁺ suII⁺ tonB⁺)
- b. ○ — ○ : HP33 (nitA18 P₂ tpeE tonB⁺)
 ● — ● : HD43 (nitA18 P₂ tpeE tonB⁺ (λ SusNnN53))

るこの *N* 非依存性 ASase 合成の量は、*N* 蛋白が存在するとき観察される ASase 合成量 (アンバーサプレッサー suII⁺ をもつ KY363 にこのフォージを感染すると *N* 蛋白が生産されるため *P*₂ プロモーターから開始したすべての転写は *CI* - att 領域まで継続する) の約 2% であった (図 7a)。すなわち nitA 変異株では、*P*₂ プロモーターから開始した転写の約 2% がただで正常に転写終結できないものと考えられる。nitA 株で見られるこの ASase の継続合成は、 λ SusNnN53 を宿主にすることにより *CI* リプレッサーを生産している nitA18 変異株を宿主に用いたときには全く観察されなかった (図 7b)。以上の実験から nitA 変異株では、*N* 蛋白がなくても *CI* フォージ左側の *CI* - att 領域の転写が可能であることが直接確認された。さらにこの *N* 非依存性転写が *CI* 遺伝子により制御を受け、また *CI* リプレッサーによって完全に抑止される事実は、その転写開始部位が *P*₂ プロモーターであることをしめている。したがって nitA 変異株では、*CI* フォージの転写終結に関与する宿主因子が変化しているものと推察される。

3-5, λ フージの右オペロンの初期遺伝子の発現に対する nitA 変異の影響

N 蛋白の作用部位は λ フージ 左オペロンの他に、右オペロンにも知られている (1-3, 参照) ので、次に nitA 変異の右オペロンの初期遺伝子の発現に対する影響を調べた。 tr_1 より下流に位置する y-o-p 領域の転写は、部分的には N 蛋白なしに進行するが、充分な発現のためには N 蛋白の存在を必要とされている。⁽³³⁾⁽³⁴⁾⁽⁸¹⁾⁽⁸²⁾

λ フージの O , o , p 遺伝子は、フージ DNA 合成に関与する遺伝子である⁽⁸³⁾。 ΔnitA 変異をもつ λ フージ溶原菌が誘発をうけると、宿主菌が致死現象を呈することが知られている (このとき、もちろん フージの成長は見られない) が、この致死効果には、 N 蛋白なしにつくられる O , P 遺伝子生産物が関係していることがわ⁽³⁴⁾⁽⁸⁴⁾⁽⁸⁵⁾かっている。すなわち $\lambda \text{CI857 } \Delta \text{nitA } N_7 N_{53}$ 溶原菌 (CI857 は $\text{P}_{\text{レリッサー}}$ の温度感受性変異) が熱処理により誘発をうけたとき、生存菌数は、 O , p 遺伝子の転写量と逆比例の関係にあると考えられる⁽⁴⁸⁾。この現象を利用して、 nitA18 変異をもつ $\lambda \text{CI857 } \Delta \text{nitA } N_7 N_{53}$ 溶原菌の熱誘発後の生存菌数と、親株 KY4710 のそれとの比較を行った (但し、 P2 フージが溶原化していない親株、 nitA18 変異株を用いた)。

表7に示したように, KY4710の場合 42°C における生存菌数の 30°C におけるそれとの比は 3.0×10^{-3} であるのに対し, *nitA18* 変異株では

表7. 欠陥入ゲージ溶原菌の熱処理による誘発後の生存菌数

Prophage Strains	$\frac{\text{Colony formers at } 42^{\circ}\text{C}}{\text{Colony formers at } 30^{\circ}\text{C}}$	
	<u>$\lambda\text{CI857susN7N53}$</u>	<u>$\lambda\text{CI857susN53susO29susP3}$</u>
HD 21 (<u><i>nitA18P2^S</i></u>)	3.5×10^{-5}	0.66
KY4710 (<u><i>nitA⁺P2^S</i></u>)	3.0×10^{-3}	0.81

- 欠陥入ゲージ溶原菌の 42°C における生存菌数を, 30°C におけるそれとの比で表わした。ペプトン培地で1晩培養した溶原菌を適当に希釈後, 2枚のペプトン寡天培地に塗布する。各寡天培地を 42°C または 30°C で一晩培養し, 生じたコロニー数を数えた。

その比は 3.5×10^{-5} であり親株に比べ約100倍低かった。これは *nitA* 株の場合, 熱処理による致死度の高いことを示している。対照実験として $\lambda\text{CI857susN7N53susO29susP3}$ 溶原菌を熱誘発させた時には, 親株でも *nitA18* 変異株でも大部分の菌は生き残り, しかも両者で顕著な差は見いだされなかった(表7)。

次に 同様の目的で, *byp* 変異をもつ λ CI857 *susN7N53* を用いた実験を行った。P と Q 遺伝子の間に位置する *byp* 変異は河らかの機構で転写終結塩基配列 σ_{32} を不活化し, N 蛋白がなくても下流の Q 遺伝子の発現を部分的に可能にすることが知られている。しかしながら λ CI857 *susN7N53byp* ファージは アバーサフレッサーをもたない *S* 菌では Q 蛋白の生産が不十分であるために増殖が悪い⁽⁶³⁾が, 新しくプロモーター様の活性をもち, γ 領域に位置する C17 変異を導入するとファージの増殖が可能になることがわかっている⁽⁸⁷⁾。すなわち λ CI857 *susN7N53byp* の増殖の程度は用いた宿主菌における λ ファージ σ -O-P 領域の発現の度合をしめあと考えられる。この現象を利用して, *nitA* 変異における λ CI857 *susN7N53byp* の増殖の程度を調べた。この実験には, P2 ファージが溶原化していない親株, *nitA* 変異株を用いた。表 8 に示したように, 親株 KJ+710 における λ CI857 *susN7N53byp* の平板効率 は 6.6×10^{-8} であるのに対し, *nitA* 変異株では平板効率は いずれも約 100 倍程度増大し, λ CI857 *susN7N53byp* の増殖を高めていることがわかった。

以上 2つの実験結果は, *nitA* 変異株における λ ファージ

表 8. *nitA* 変異株における λ CI857_{susN7N53byp} の平板効率

Bacteria	Phage λ CI857N7N53byp (E.O.P. $\times 10^{-7}$)
HD 16 (<i>nitA</i> 6P2 ^S)	104
HD 19 (<i>nitA</i> 16P2 ^S)	50
HD 21 (<i>nitA</i> 18P2 ^S)	50
KY4710(<i>nitA</i> ⁺ P2 ^S)	0.66

- すべて一夜培養後の菌を用いて、実験を行った。
方法については 2-4, 参照

右オペロンの γ -O-P 領域における N 非依存性の転写量が、親株に比較して増大していることを強く示唆している。

3-6. *nitA* 変異の大腸菌染色体上における位置

nitA 変異の染色体における位置を知るために、*nitA* 変異株の親株, KY4727 と 等しい遺伝的 (isogenic) 背景をもつ, KY4737 や KY4738 (いずれも P2 フージの溶原菌である) などの Hfr 株と *nitA* 株との掛け合わせ実験を行った。その結果, *nitA* 変異は Taylorらによる染色体地図⁽⁶⁶⁾ の 74.7 分に位置する *ilv* 遺伝子に強く連関していることがわかった。次に P1 フージによる

表 9. P_{lin} マージを用いた $nitA6$ 変異のマッピング

a)	Donor	:	KH39	(<u>ilv</u> ⁺ <u>nitA</u> ⁺ <u>metE</u>)	
	Recipient	:	HD10	(<u>ilv</u> <u>nitA6</u> <u>metE</u> ⁺)	
Selected marker		Unselected markers		Number of transductants	Frequency (%)
		<u>nitA</u>	<u>metE</u>		
<u>ilv</u> ⁺				100	
		1	1	2	2
		1	0	79	79
		0	0	19	19
		0	1	0	0
b)	Donor	:	HD10	(<u>ilv</u> <u>nitA6</u> <u>metE</u> ⁺)	
	Recipient	:	KY4742	(<u>ilv</u> ⁺ <u>nitA</u> ⁺ <u>metE</u>)	
Selected marker		Unselected markers		Number of transductants	Frequency (%)
		<u>ilv</u>	<u>nitA</u>		
<u>metE</u> ⁺				100	
		1	1	48	48
		0	1	9	9
		0	0	43	43
		1	0	0	0

- 37°C で実験を行った。
- 供体菌で殖やした P_{lin} マージを受容菌に感染後、適当な選抜最小培地に塗布する。詳細については 2-7 参照。
- nit 遺伝子の表現型は、EMB-0 寒天培地上の λ SVS N_1 $min5$ とのクロスストリーク法により調べた。
- 1, 2 は 0 は 供体菌, または 受容菌 由来の 遺伝子 マーカーを表わす。

形質導入の実験を行ったところ、表9(前ページ)に示すように、*nitA6*変異は *ilv* 遺伝子に非常に近接し(79%同時形質導入)、しかも *metE* 遺伝子側に位置することがわかった(図8)。*nitA16*, *nitA18* 変異についても同様の結果が得られたので、これらの3つの *nitA* 変異は *ilv* - *metE* 遺伝子間に位置し、おそらく同じ、または非常に隣接した遺伝子内に起きた単一変異(single mutation)であると推定される(これらの理由により、多くの *nit* 変異株のなかの先の3つの変異株を“*nitA* 変異株”と呼んだ)。

次に *nitA* 変異の野生型遺伝子に対する優劣性試験を試みた。*nitA* 遺伝子の部分二倍体は *ilv* - *nitA* 遺伝子領域を保持しているF'因子、F14, KHF50⁽⁷⁶⁾, F16を用いて調製

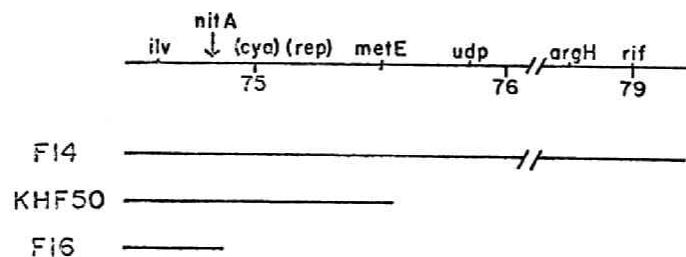


図8, 染色体上の *nitA* 遺伝子の位置, 並びに用いたF'因子が保持している大腸菌の染色体領域

- 遺伝子名については文献(66)参照。
- *nitA*, *cya*, *rep* 遺伝子の相対的位置関係は明らかでない。

した (図 8)。すなわち これらの F' 因子 をもつ菌を供与菌とし, *ilv* 遺伝子に変異をもつ *nitA18* 株を受容菌として掛け合わせを行い, *Ilv*⁺ クローンを選抜する。このようにして得られた *Ilv*⁺ クローンは, 雄菌特異的 RNA 聚合に感受性をしめし, また *recA* 変異をもつ受容菌に対しそれぞれの F' 因子を移入する能力を保持していたので, *nitA* 遺伝子に関し ヘテロ部分二倍体であると考えられる。これらのヘテロ部分二倍体の大部分は λ_{susN} *nin5* 聚合に対する抵抗性を失い, 感受性を回復した。すなわち *nitA* 変異は野生型に対し劣性であり, したがって *nitA* 変異株では転写終結に関する因子に欠陥をもつと考えられる。

3-7. 高温致死性 *nitA* 変異株の分離

以上, *nitA* 変異に関して得られた知見, すなわち *nitA* 変異株では N 蛋白がなくとも λ 聚合の初期転写は終結しないこと, また *nitA* 株では終結機能欠損の性質が劣性をしめすことは, *nitA* が大腸菌の転写終結因子 ρ に関係する遺伝子であると考えればうまく説明される。事実 後に 4-2 の項で述べるように, *nitA18* 変異株より

精製した ρ 因子は、親株のそれに比して グリセロール 低濃度 (5%) の条件で非常に不安定であり、またトリプシンに対する感受性も著しく増していた。⁽¹¹⁹⁾ また mitA 変異株では ρ 因子の性質が変化したため、転写終結の機能に欠損を生じたことが確認された。⁽¹¹⁹⁾ しかしながら いままで分離した mitA18 変異を含む 4 株の mitA 変異株の生育は、調べた条件では、すべて野生株とほとんど同様に正常であった。このことは、 ρ 因子は 生体内で エンタージの転写終結には関係しているが、大腸菌の転写終結にも機能しているのかという問題を残した。そこで ρ 因子が大腸菌の転写終結機構に必須な因子かどうかを明らかにする目的で、低温で $\lambda_{\text{SOSN7 min5}}$ に抵抗性をしめし、高温で生育できない 高温致死性 mitA 変異株の分離を試みた。

分離の基本的な手段として、*nitrosoguanidine* による *localized mutagenesis* の方法を用いた。⁽¹¹⁸⁾ 強力な突然変異誘起剤である *nitrosoguanidine* は、大腸菌の染色体上のごく狭い領域 (Taylorらの染色体地図で約 1 分の領域⁽⁶⁶⁾) に同時に多くの突然変異を誘起することが知られている⁽⁸⁸⁾。したがって mitA 遺伝子が ilv 遺伝子に非常に近接して位置する (79% 同時形質導入, 3-6 参照) 事実を利用し、 ilv 遺

伝子を隣接遺伝子マーカーとしてこの方法を適用した。親株として, *ilv* 遺伝子に変異をもつ P273-ジシテ原菌, KY4792 を用いた。この株は また温度感受性アンバーサプレッサーである *sup126* 変異⁽⁷⁷⁾ をもっているので, *nitA* 遺伝子のアンバー変異も分離することが出来る (但し, *sup126* 変異は入アージ *N* のアンバー変異を 30°C にも抑制 (suppression) できないので, KY4792 は *λ*_{SusN₇min5} に対し感受性をしめし *nit* 変異株の分離に支障はきたさない)。

N-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine 処理した

KY4792 (*ilv*⁻) から, *ilv*⁺ クローンを まず選別する。続いて これら *ilv*⁺ クローンから, 42°C で生育できない温度感受性変異株を レプリカ法により選ぶ。次に これらの変異株から, 大腸菌の染色体の *ilv*-*nitA* 領域をもつ F' 因子である F16 (図 8) を導入することによって, 42°C での生育が回復するような変異株を 同じレプリカ法で選別する。さらに これら 高温致死性変異株から, 30°C で *λ*_{SusN₇min5} に対し感受性をしめす クローン (*Nit*⁻) を選別する。最後に これらの変異株について P1 *in situ* を用いた形質導入実験により, *Nit*⁻ 性, および 高温致死性変異が *ilv*-*metE* 遺伝子間には置する株を選ぶ。このような方法により, 約 18,000 の *ilv*⁺ クローンから

4ヶの高温致死性変異株が分離されたが、以後代表的な HD136 (*nitA* 112^{ts})、および HD138 (*nitA* 702^{ts}) 株について詳細な解析を行った。

3-8. 高温致死性 *nitA* 変異の確認

nitA 112^{ts}、および *nitA* 702^{ts} 変異は *Pluv* フージによる形質導入実験の結果、予想どおり *ilv* - *metE* 遺伝子間に位置し、それぞれ *ilv* 遺伝子と 60.5%, 81.9%, *metE* 遺伝子とは 10.6%, 9.1% の同時形質導入頻度をしめした。このとき *Pluv* フージによる形質導入実験では、*Nit*⁻性、および高温致死性という表現型は分離しなかった。またこれらの *nitA* 112^{ts}、および *nitA* 702^{ts} 変異株から、自然誘発により高温で生育可能な復帰変異株を分離したところ、*nitA* 702^{ts} 変異株の場合独立に得られた6株のうちすべてが、*nitA* 112^{ts} 変異株の場合には独立に得られた9株のうち6株の高頻度で、同時に *Nit*⁻性の表現型を決っていた。これらの事実は、*nitA* 112^{ts}、および *nitA* 702^{ts} 変異株の高温感受性と *Nit*⁻性の性質が単一変異によることをしめしている。

これら *nitA* ^{ts} 変異株に、アンバーサプレッサー変異 *suI*⁺ を保

持ある F'因子 KHF6⁽⁷⁶⁾ や $su III^+$ 遺伝子を組みこんだ形質導入マージ
 $\phi 80psu III^+$ を導入すると, $nit A 702^{ts}$ 変異株は依然として高温で生
 育できないが, $nit A 112^{ts}$ 変異株では高温耐性生になることがわかった。
 すなわち $nit A 112^{ts}$ 変異はア-バー変異であり, $nit A 702^{ts}$ 変異は
 ミスセンス変異であると考えられる。また我々の研究室で分離した形質
 導入マージ $\phi 80dnit A^+$ ⁽⁸⁹⁾ を導入すると, もちろん両変異株とも高温で
 生育可能になることがわかった。

次に 30°C で培養した $nit A 112^{ts}$, あまは $nit A 702^{ts}$ 変異株を 42°C
 に移した後の生育を, 濁度とコロニー形成菌数を測定することにより
 追跡した。図 9 (次ページ) にしめあうに, 両変異株とも濁度の
 上昇は 42°C 移行後 約 3 時間まで続くが, その後は停止するのが観
 察された。一方, 生存菌数は 42°C 移行後 約 30 分から対数的に減少して
 いくことがわかった。光学顕微鏡による観察から, この時期に
 おいては多くの細胞が糸状 (filamentous) 形態をとっている
 ことが認められた。

図 9 (次ページ) の説明

- $nit A$ 変異株をペプトン培地中で対数増殖期まで培養し, 0 time に
 2つに分けた後, 各々 30°C と 42°C で培養する。

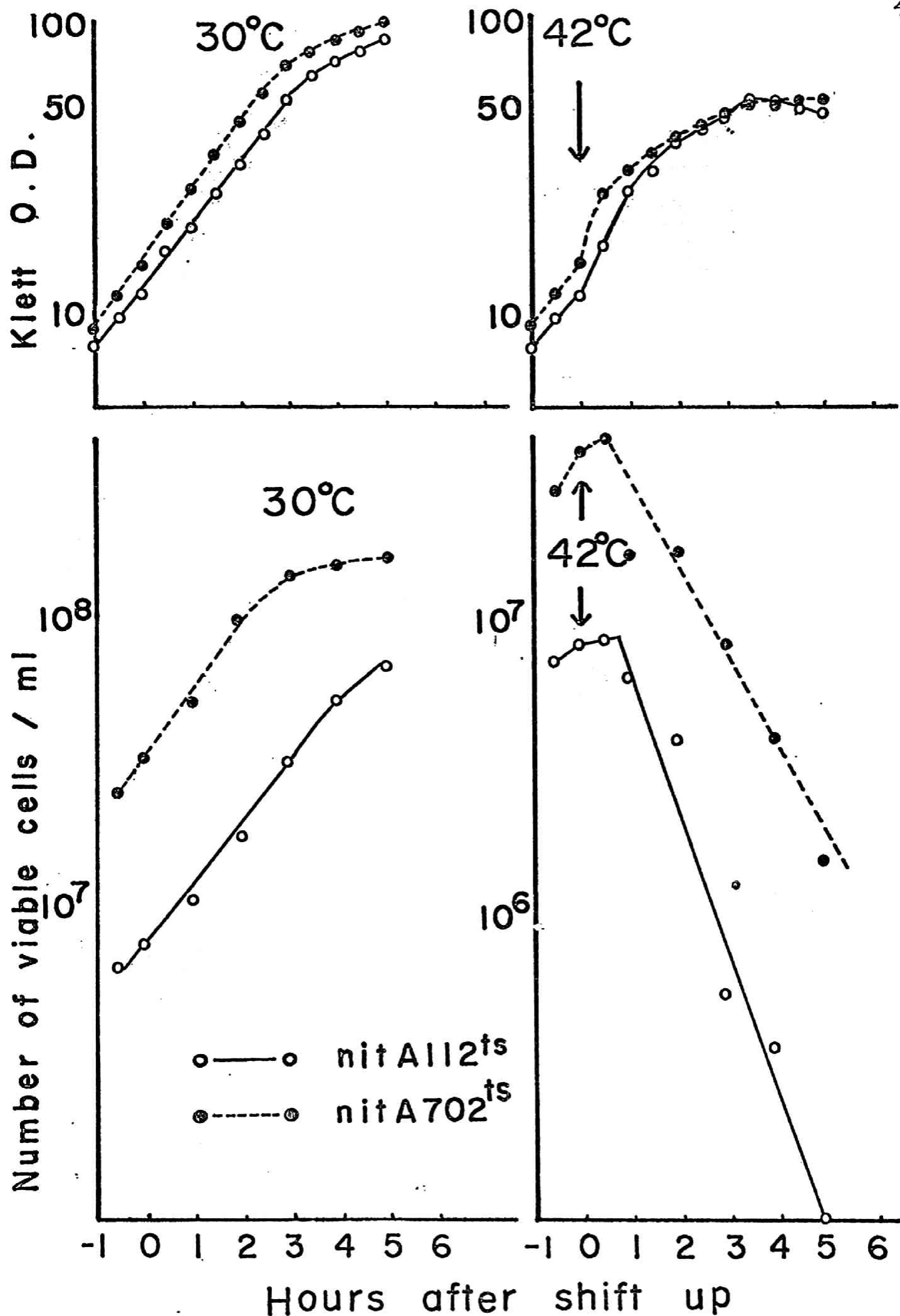


図9. *nitA^{ts}* 変異株の生育 (説明には前ページ参照)

3-9. 高温致死性 *nitA* 変異株における転写終結の異常

*nitA*112^{ts}, および *nitA*702^{ts} 変異株は, 30°C で $\lambda_{susN7nin5}$ に抵抗性を示した。30°C における $\lambda_{susN7nin5}$ の平板効率は表10に示すように,

表10, 高温致死性 *nitA* 変異株の各ファージに対する感受性, および平板効率

	$\lambda_{susN7nin5}$	$\lambda_{susN7nin5spi}$
HD 136 (<i>nitA</i> 112)	R (1.0×10^{-5})	S (0.43)
HD 138 (<i>nitA</i> 702)	R (3.2×10^{-5})	S (0.77)
KY4792 (<i>nitA</i> ⁺)	S (1.0)	S (1.0)
HD 149 (<i>nitA</i> 112P2 ^S)	S (0.97)	-
HD 152 (<i>nitA</i> 702P2 ^S)	S (1.0)	-
KH 54 (<i>nitA</i> ⁺ P2 ^S)	S (1.0)	-

- すべて 30°C で実験を行った。
- P2非溶原性の *nitA* 変異株は次のように調製した。 *nitA*112, および *nitA*702 変異株の溶原P2ファージは, 宿主染色体上の *metE* 遺伝子に近接した site II⁽⁹⁰⁾ に組み込まれている。したがって P2非溶原菌で培養した *Pi* *min* ファージを用いて, *nitA* 変異株の *metE* - site II 領域間の遺伝子を, 形質導入により供与菌由来のそれに置き換れば, 高頻度で P2非溶原菌が得られる。
- その他の説明に関しては 表4 参照。

それぞれ 1.0×10^{-5} , 3.2×10^{-5} であった。これらの値は, 前に述べた生菌の正常な3々の *nitA* 変異株 (*nitA*6, *A*16, *A*15) における $\lambda_{susN7nin5}$ の平板効率が 0.01 ~ 0.25 の範囲であった (表4) のに比べると, *nitA*112^{ts} および *nitA*702^{ts}

変異株が $\lambda_{susN7n5}$ に対し非常に高い抵抗性を保持していることしめすものである。これら $mitA^{ts}$ 変異株でも $\lambda_{susN7n5spi}$ に対しては親株にほぼ同様の感受性をしめた(表10)。同様に p_2 非溶原性の $mitA112^{ts}$, および $mitA702^{ts}$ 変異株 (この調製に関しては表10の説明参照) における $\lambda_{susN7n5}$ の 30° での平板効率も、ほぼ1.0であった(表10)。以上の結果は、 $mitA^{ts}$ 変異株では λ フージ左オペロンにおける転写は、終結点で停止できずに多量継続 (read through) する結果、N蛋白に依存しないIII-att領域の発現が非常に高まっていることを示唆している。

上に述べた継続転写量を直接に測定するために、3-4と同様に $\lambda_{susN7N53ptp46}$ フージ⁽⁴⁰⁾ (図5) 感染後の ASase 合成量を調べた。図10(次ページ)に示したように、 $mitA112^{ts}$, および $mitA702^{ts}$ 変異株に $\lambda_{susN7N53ptp46}$ を 30° で感染させると、N非依存性 ASase 合成が親株 $\lambda 4772$ に比して、顕著に増大することがわかった。この合成量は転写で終結できない転写量を表わしている。そこでアンバーサナル⁺ S_{II}^+ をもつ $\lambda 1363$ にこのフージを感染させ、N依存的に合成される ASase の合成量 (この条件下では、 p_L プロモーターから開始する左方向の転写は、すべて CIII-att 領域へ継続する) を100%とすれば、 $mitA112$ 変異株では

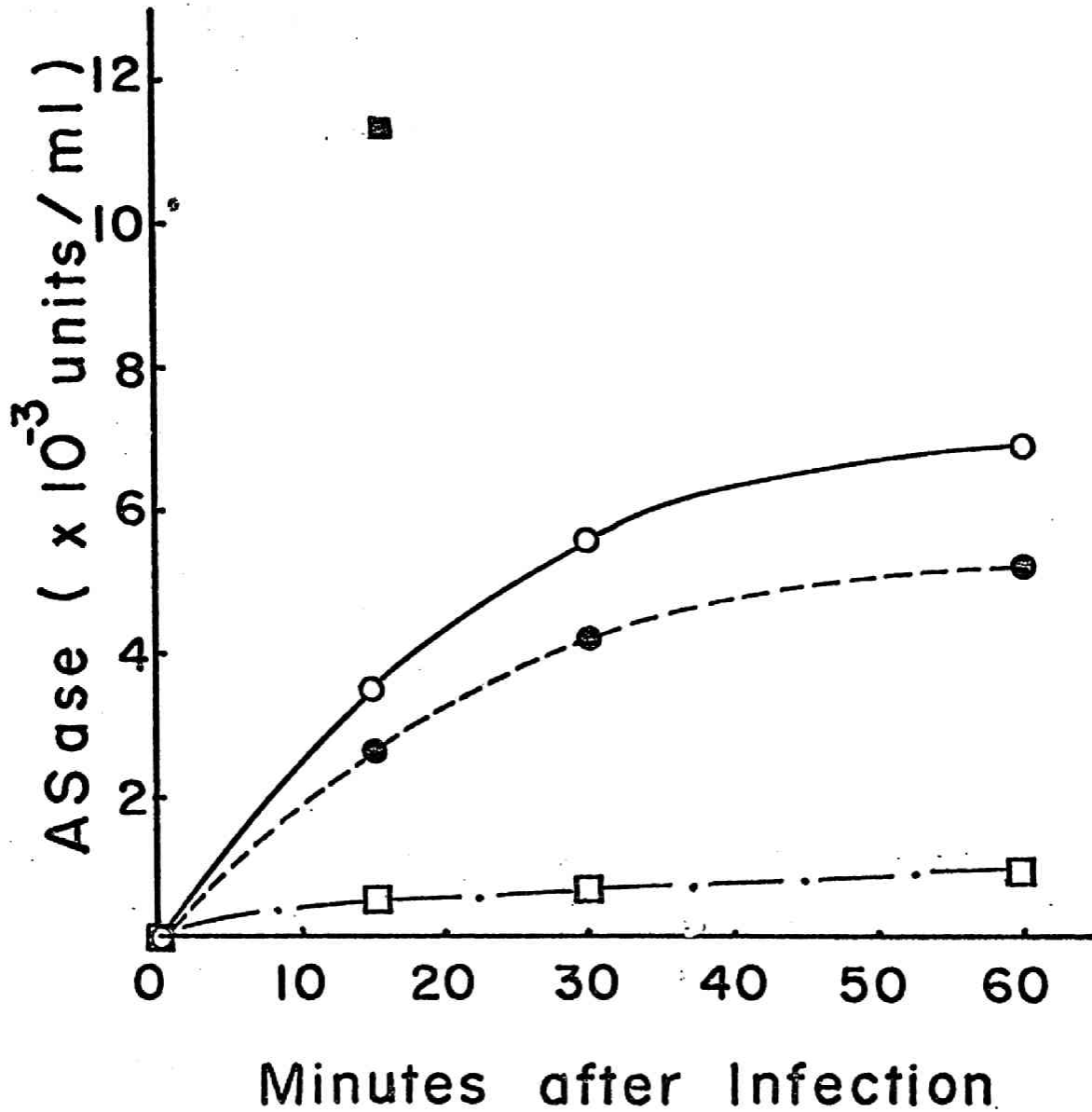


図 10, $nitA^{ts}$ 変異株に $\lambda_{susN_1N_3ptp46}$ 感染後の ASase 合成

- 30°C で実験を行った。

方法, 説明については 図 6 参照。なお, m.o.i. = 5 で 73-J を吸着させた。

- ——— ○ : HD136 ($nitA^{112} tpe$)
- - - - ● : HD138 ($nitA^{702} tpe$)
- △ — . — △ : KY4792 ($nitA^+ tpe$)
- : KY363 ($nitA^+ suII^+$)

約30%, $\text{nit A } 702^{ts}$ 変異で約20% がN蛋白がなくても, t_L で正常に転写終結できないと考えられる。先に述べた正常な生育をしめす $\text{nit A } 18$ 変異株では, この終結できない転写量が約2% である(3-4, 参照)のに対して, 高温致死性 nit A^{ts} 変異株では約10倍多く, nit A^{ts} 株が $\lambda_{sus} N_7 \text{ min } 5$ に対し高い拮抗性を獲得しているという結果(表10)とよく一致している。

次に nit A^{ts} 変異が λ P₂-ジ右オペロンの遺伝子発現におよぼす影響を調べるために, 3-5 に述べたのと同じ原理で30°C における $\lambda \text{ CI857 } \text{ sus } N_7 N_{53} \text{ by } p^{(86)}$, $\lambda_{sus} N_7$, および $\lambda_{sus} N_7 N_{53}$ 各 P₂-ジの増殖を調べた。但しここでも用いた親株, nit A^{ts} 変異株には P₂ P₂-ジは溶原化していない。表11 (次ページ) にしめたように, $\lambda \text{ CI857 } \text{ sus } N_7 N_{53} \text{ by } p$ の30°C における平板効率 は親株で 1.7×10^{-4} であるのに対し, 2つの nit A^{ts} 変異株では, 大体 1.0 に近い値をしめし, ほぼ完全に増殖を許すことがわかった。また $\lambda_{sus} N_7$ の平板効率は親株では 4.7×10^{-7} であるのに対し, $\text{nit A } 112^{ts}$ 変異株では 3.7×10^{-2} , $\text{nit A } 702^{ts}$ 変異株では 6.6×10^{-2} で約105倍の上昇が見られた。 $\lambda_{sus} N_7 N_{53}$ についても, 結果は基本的に同じであった。

表11, nitA^{ts} 変異株における各 λsusN^{-} 73-ジの平板効率

	$\lambda\text{susN7N53bypCI857}$	λsusN7	$\lambda\text{susN7N53}$
HD 149 ($\text{nitA112P2}^{\text{S}}$)	0.75	3.7×10^{-2}	3.0×10^{-2}
HD 152 ($\text{nitA702P2}^{\text{S}}$)	0.56	6.6×10^{-2}	2.5×10^{-2}
KH 54 ($\text{nitA}^{+}\text{P2}^{\text{S}}$)	1.7×10^{-4}	4.7×10^{-7}	$< 2.5 \times 10^{-7}$

- ・ 30°C で実験を行った。
- ・ すべて、一夜培養後の菌を用いて実験を行った。
- ・ 方法については 2-4. 参照。

以上の結果は、 $\text{nitA112}^{\text{ts}}$, A702^{ts} 変異株では、N蛋白がなくても存在プロン
のCII-O-P-Q領域の転写量が親株に比して多いことを示唆している。
その量はまた、先の nitA6 , A16 , A18 変異株が $\lambda\text{CI857 susN}_{\text{N53byp}}$
(表8 参照)や λsusN7 の平板効率を、 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ と低い値に留めて
いるのに比べても、これら高温致死的な nitA 変異株では著しく高いこ
とが明らかになった。おそらくこれら nitA^{ts} 変異株においては、PRプロモ
ーターから開始した「入ゲージ」転写のうち、相当の量（その
終結点 tr_1 で正常に終結できず、N非依存的反転転写を行って
いると考えられる。

4. 考察

4-1. *nitA* (*ts*⁺) 変異株の遺伝学的解析

突然変異誘起剤で処理した P2 フージ溶原菌 (*Su*⁻) より, λ *SusN7min5* に対し抵抗性をしめす変異株 *nit* が約 10^{-3} の頻度で分離されるが, この論文では変異が染色体上 *ilv* - *metE* 間に位置する一群の *nitA* 変異株の性質について述べた。*nitA* 変異は転写終結機能に異常を起し, 本来ならば フージ N 蛋白の存在を必要とする λ フージ左オペロンの CIII - *att* 領域, および右オペロンの γ - O - P 領域の転写を N 蛋白に依存せず, 可能にさせることがわかった。すなわち λ フージの性質を利用して考察した, このような分離方法が転写調節に関する変異株の分離に有効であることをいしている (詳細については後述)。

λ フージの Q 遺伝子も同様に, その転写には N 蛋白の存在を必要とし⁽⁴²⁾, P と Q の遺伝子間に位置する *trn*₂ が N 蛋白の作用部位と考えられている⁽³⁰⁾ (1-3 参照)。*nitA* (*ts*⁺) 変異の Q 遺伝子の発現におよぼす影響は現在までのところ不明である。すなわち *nitA* (*ts*⁺) 変異が λ *SusN7*, λ *SusN7NS3*, および λ *SusN7C17* のような λ *SusN*⁻ フージの増殖を促進する効果は検出できなかった。この

問題を明らかにするためには、 λ 遺伝子生産物の活性を測定するお
 感度の高い方法の開発に待たなければならないだろう。

nit A 変異株における λ ϕ -ジの CIII-*att* 領域の N-非
 依存性転写量は、 λ *Sus N7 N53 p_{trp} 46* ϕ -ジ感染後の ASase の合成
 量を測定することにより、直接的に証明された(図7)。なお、ASase 活
 性は非常に高い測定感度をもっているので、上記の実験系は微量の酵
 素合成を検出するのに適した方法であるといえよう。N 蛋白に依存しな
 い ASase 合成は ϕ -ジ感染後 10 分以上降になると上昇が停止
 (turn off) することから、 λ ϕ -ジ *tof* 遺伝子生産物において調節を受け
 ていることがわかった⁽⁷⁹⁾。また CII リプレッサーが存在するとこの ASase
 合成は全く認められなかった(図7)。既に *tof* 蛋白、あるいは CII リプ
 レッサーは *trp* オペロンの *p_{trp}* (または、*p_{trp}*) オペレーターに、おそらく結合
 することにより *p_{trp}* プロモーターから開始する転写を停止 (turn off),
 あるいは抑止 (repress) させることが知られている⁽⁹¹⁾⁽⁹²⁾⁽⁹³⁾⁽⁹⁴⁾⁽⁹⁵⁾⁽⁹⁶⁾。

したがって *nit A* 変異株における N 非依存性転写は、CIII-*att* 領
 域に位置する新しいプロモーター様の部位から開始しているのではなく、
p_{trp} プロモーターから開始していると考えられる。すなわち *nit A* 変異は転

写の開始に関する変異ではなく 転写終結機能の変異であり、この変異株では、 P_L プロモーターから開始した転写の一部が N と $CIII$ 間に位置するまで終結できず、下流に位置する $CIII - att$ 領域にまで継続するものと結論される。

$mut A$ (カ+) 変異株で観察される N 非依存性の $ASase$ 合成量は、 N 蛋白存在下での $ASase$ 合成量に比して わずか 2% であった。すなわち P_L プロモーターから開始した転写量の 2% が 転点で終結できず、継続転写していることをしめしている。このような低い値をしめす原因として、次のような可能性が考えられる。まず ここで基準としている N 依存性の $ASase$ 合成量は、 N 蛋白が存在すると P_L プロモーターからの転写の開始が促進されるという知見がある⁽⁹⁷⁾ ので、実際には 100% 以上であり、 N 非依存性の 2% という値は低く見積り過ぎている可能性がある。次に N 蛋白存在下では入ゲージの DNA 複製が正常に進行するが、 N 蛋白が存在しない条件ではわずかにしか進行しないことが知られている。⁽³³⁾⁽³⁴⁾⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾ すなわち N 蛋白存在下では、 λ -ゲージゲムに存在するトリプトファン遺伝子コピーの増加による影響⁽²⁷⁾⁽⁷⁸⁾ を考慮する必要があり、したがって結果的には先と同様、2% という値は低く見積り過ぎているかもしれない。第3に、 $mut A$ 遺伝子

の生産物である転写終結因子（後述あるように、 ρ 因子であることが判明している）が大腸菌の転写調節に重要な役割をにっているため、菌の生育に影響をおよぼさない *nitA* 変異株 (*nitA* 6, A16, A18) として分離されるものは、転写終結機能の欠損程度が軽微なものに限られるという可能性もある。少なくとも第3の可能性が正しいことは本論文の後半に述べたように、条件致死性 *nitA*^{ts} 変異株では、転写終結機能の異常度が *nitA* (ts+) 変異株に比べ著しく高いという事実によって明らかになった。

nitA 遺伝子は遺伝解析の結果、*ilv-met* に遺伝子間に位置することがわかった。独立に分離した3つの *nitA* 変異がすべて *ilv-met* に遺伝子間に位置する事実は、おそらく *nitA* 変異が単一変異に由来するであろうことをしめしている。従来この領域に位置する遺伝子として、*rep* (P23-ジなどのDNA合成に関係する⁽⁹⁸⁾)、*cya* (アデニルサイクレーズの構造遺伝子⁽⁹⁹⁾)、*sup U*, および *sup V*⁽¹⁰⁰⁾, *su A* (polarity suppressor⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰²⁾ 後述) の各遺伝子の存在が知られている。しかしながら *nitA* 変異株は P23-ジの増殖を阻害しないし、糸状醗酵能も正常であり、またアンバーサプレッサー活性も獲得していないので、*nitA* 遺伝

子は *rep*, *cya*, *supU*, および *supV* 遺伝子とは関係ないと考えられる。なお, *svA* 遺伝子との異同に関しては 4-5 で詳述する。

4-2, *nitA* (*wt*) 変異株の ρ 因子の生化学的解析

nitA 変異について明らかになった事実, あるいは 転写終結機能の異常の結果, λ -ファージ N 蛋白に依存しない転写が可能であること, *nitA* 変異が野生型に対し劣性をしめすこと, と λ -ファージ N 蛋白が転写終結因子 ρ と拮抗し, 抗終結因子 (anti terminator, 1-3, 1-5 参照) として機能するというモデルを考慮すれば, *nitA* は ρ 因子に関与した遺伝子である可能性が容易に想像される。そしてこの可能性は我々の研究室にて行われた *nitA* 変異株の ρ 因子についての生化学的解析により実証された。⁽¹¹⁹⁾

nitA 18 変異株より Roberts による方法⁽²⁹⁾ で ρ 因子の精製を試みたが, ρ 因子の活性 (RNA 依存 ATPase 活性⁽⁵⁵⁾, および転写終結活性⁽²⁹⁾) を検出することが困難であった。詳細な検索の結果, *nitA* 18 変異株の ρ 因子は菌体内プロテアーゼに対する感受性を増したために, 細胞破砕後 粗抽出液を調製する過程で断片

化を受け不活性化することが判明した。そこで精製に用いるバッファーにプロテアーゼ阻害剤である DIFP (ジイソプロピルフルオロリン酸) 5 mM, と安定化剤としてグリセロール 20% を加えることにより, *nitA18* 変異株の p 因子が分離, 精製された。精製された *nitA18* 変異株の p 因子は親株のそれに対して, グリセロール低濃度 (5%) の条件下で不安定であった。高濃度グリセロール (20%) 存在下でも精製 *nitA18* p 蛋白は転写終結活性が親株の約 20% に低下しており, トリプシンに対する感受性も親株のそれに対して著しく増大していた。これらの結果より, *nitA18* 変異は確かに p 蛋白に変化を起しており, *nitA* は p 因子に関連した遺伝子であることを示唆している (なお, 後述するように *nitA*^{ts} 変異株の遺伝生化学的解析の結果, *nitA* は p 因子の構造遺伝子であることが証明された)。すなわち p 因子が実際に生体内で入フェージの転写終結に機能していることがしめされた最初の知見であろう。

4-3. 高温致死性 *nitA* 変異株の遺伝学的解析

nitA (ts⁺) 変異株の解析から, *nitA* が p 因子に関連した遺伝子であることが示唆され, 入フェージの転写終結に *in vivo* で p 因子

が機能している事実が明らかにされた。次に生体内で大腸菌の転写終結に ρ 因子が関与しているか否か、また ρ 因子による終結が大腸菌の転写調節に必要な素過程であるかどうかを知るために、高温致死性の nitA^{ts} 変異株の分離を試みた。その結果、 nitA112^{ts} 、 nitA702^{ts} の二つの変異株が得られた。これらの変異株が得られる頻度は Nitrosoguanidine による *localized mutagenesis* を利用したにも拘らず、約 2.2×10^{-4} (4500 の IV^+ フローニに1々の割合) であり、 nitA^{ts+} 変異株の得られる時の高い頻度に比べ、予想外に分離が困難であった。この事実は ρ 因子の高温致死性変異株の多くが 90°C でも致死性であることをしめしているのかもしれない。

得られた2つの nitA^{ts} 変異株は nitA^{ts+} 変異株に比べ、 $\lambda_{\text{SUSN7}} \text{nin5}$ に対し非常に高い抵抗性をしめし、また λ_{SUSN^-} の増殖をかなりの程度にまで可能にするという結果は、 λ ファージの trL 、および少くとも trI 終結点を N 蛋白に依存しないで、読み過ぎす多量の転写が存在することを示唆している。実際 $\lambda_{\text{SUSN7N53}} \text{ptp46}$ 感染後の $ASase$ 合成を測定した実験から、 nitA^{ts} 変異株では λ ファージの P_L プロモーターから開始した転写が

約20~30%という高い効率で ψ を乗り越え、その結果下流の遺伝子群が継続転写されることがわかった。おそらくこのように転写終結機能にかなりの程度の欠損をうけたことが条件致死性をしめす重大な原因であろうと考えられ、4-1で議論した、正常な生育をしめす $nit A$ (ψ^+) 変異株の場合は転写終結機能の欠損の程度が軽微であるという事実もうまく説明される。なお、 $nit A$ の変異が入子-3の右オペロンの第2の転写終結点である ψR_2 での終結におよぼす影響は完全には明らかでない。入 $SUSN$ -73-3の増殖を許すという事実は、少なくとも2遺伝子の転写が微量に存在することをしめしているが、この原因が第1の転写終結シグナル ψR_1 において終結できない転写量が多いために、すなわち上流からの微量の転写が存在するために ψR_2 より下流にある2遺伝子の転写のバックグラウンドが引き揚げられるのか、それとも ψR_2 部位における転写終結の異常そのものによるかは現在手での実験では判定できないからである。

$nit A^{ts}$ 変異株では高温で RNA, 蛋白合成は継続し、 β -ガラクトシダーゼの誘導も正常に起るが、高温 (42°C) 後行後約30分か

ら、細胞はほぼ対数的に死に始めることがわかった。なお、*nitA702^{ts}* 変異株が高温で産生する RNA をフェール法で抽出後、蔗糖密度勾配遠心法によりその分子量を調べたところ、親株のそれと比べて全体的に長い RNA 鎖が産生される傾向にあり、また 4S 付近の大きさをもつ RNA へと分解される速度が非常に遅いという知見が得られている⁽¹¹¹⁾。これらの現象を理解するためにはさらに詳細な解析が必要であるが、少なくとも ρ 因子の機能の欠損が、細胞の RNA 産生の動態に大きく影響していることは確かであろう。また *nitA^{ts}* 変異株では λ C₂ T₄ フージの増殖はあまり影響されないが、T₄、入フージの増殖は観察されなかった⁽¹¹¹⁾。すなわち T₄、および入フージの増殖には、 ρ 因子による正常な転写終結が必要であることが明らかになった。

以上の結果は、 ρ 因子が大腸菌における転写終結に関与していることを初めて実証し、同時に ρ 因子による正常な終結が大腸菌などの転写調節に必要な素過程であることを強く示唆するものである。今後の課題は、融合ホロソン (例えば *sup*-*lac* 系)、⁽³⁴⁾⁽⁵¹⁾⁽¹⁰³⁾⁽¹⁰⁴⁾ や insertion genome などを用いて *nitA^{ts}* 変異が大腸菌の転写終結におよぼす影響を直接調べることや、大腸菌の各 mRNA

(例えば $trp^{(50)}$, $gal^{(51)}$, $lac^{(51)}$ mRNA) や, フォージ ($T_7^{(53)}$, $\lambda^{(29)}$, $T_4^{(52)}$, $fd^{(54)}$) の オペロン 特異的な産物 RNA の分子量や分布に, $mitA$ の変異がおおぼろしく影響を調べることにより, ρ 因子の生理学的役割を追究することにあると考えられる。

4-4, 高温致死性 $mitA$ 変異株の ρ 因子の生化学的解析

$mitA702^{ts}$ 変異株の ρ 因子が保持する生化学的性質については, 我々の研究室で行われた生化学的解析により明らかにされた⁽¹¹⁹⁾。 $mitA702^{ts}$ 株の ρ 因子は, $mitA18$ 株のそれよりもさらに生化学的性質が変化していることがわかった。Roberts 法⁽²⁹⁾による精製は不可能で高濃度グリセロール(20%), おおむね DIFP(5mM)の添加を必要とし, 最終段階で DNA セルロースカラムを用いることにより均一な蛋白として精製された。この ρ 因子は, 45°C 10 分間の熱処理により完全に失活し, 親株の ρ 因子に比べはるかに熱不安定性を示した。また転写終結能の低下が著しく, 活性の測定が困難であった。以上の *in vitro* で得られた結果は, 遺伝学的解析により明らかにされた, *in vivo* における転写終結能の低下(図10), 並びに高温致死性(図9)の諸性質と良い対応を示めると考えられる。

$\text{mitA702}^{\text{ts}}$ 変異株の ρ 因子は、 χ の他の生化学的性質についても変化が著しいことがわかった。RNA 依存 ATPase 活性に関しては、イオン強度の増加と共に活性が低下し、 0.2M KCl でほぼ完全に不活化した（野生型の ρ 因子の場合は全適イオン強度は $0.2 \sim 0.3\text{M}$ ）。分子会合能に関しては、野生型の ρ 因子が 9S （テトラマー）を形成するの⁽²⁹⁾に⁽²⁹⁾対し、 $\text{mitA702}^{\text{ts}}$ 変異株の ρ 因子は 5.5S （ダイマー）しか形成できないのが認められた。さらに $\text{mitA702}^{\text{ts}}$ 株の ρ 因子は、野生型の ρ 因子に比べ DNA や RNA に対する結合能が低いことがわかった。

これらの知見から、 $\text{mitA702}^{\text{ts}}$ 株は確かに ρ 因子に関する変異株であり、しかも熱不安定性をしめすことから mitA 遺伝子は ρ 因子の構造遺伝子であると結論される。さらに今後明らかにされねばならぬ問題として、変異型 ρ 因子の転写終結活性低下の原因が RNA 依存 ATPase 活性、DNA, RNA, RNA ポリメラーゼに対する結合能、あるいは DNA-RNA-RNA ポリメラーゼ複合体の解離促進活性のうちのどの機能にあるかを同定することにより、 ρ 因子による転写終結の分子機構を明らかにあることであると考えられる。

4-5. 転写終結のモデル — *nitA* 遺伝子と *suA* 遺伝子との関連

あるシストロンに起きたアンバー変異が、そのシストロンはもちろんオペロン内のその後続く下流のすべてのシストロンの発現を同時に抑制する現象⁽¹⁰¹⁾が知られている。この現象は“極性 (polarity) 効果”と呼ばれている。極性効果の原因として、現在次の2つの解釈がなされている。その1つは Morse らにより提唱されたモデルで、オペロンのすべてのシストロンの RNA は合成されるがアンバー変異を起した部位より下流の RNA はアンバー変異を翻訳終結点 (シグナル) として読みとられる結果、リボソームが結合せず直ちに菌体内のある RNase により分解をうけるというモデル⁽¹⁰²⁾⁽¹⁰⁵⁾である。一方 Imamoto らによる、いわゆるカップリング (Coupling) 説によれば、翻訳機構と転写機構は常に互いに影響しあう関係にあり、アンバー変異により翻訳機構が停止すると直ちに転写機構も機能を停止し下流の RNA 合成が起らなくなると解釈される⁽¹⁰⁶⁾。

suA 変異株はこの極性効果を抑制する変異 (polarity suppressor) 株として分離された⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰²⁾⁽¹⁰⁷⁾。すなわち *suA* 変異株では、アンバー変異をもつシストロンの発現は元のまま抑制を

うけるが、それに続く下流のオペロン内のすべてのシストロンの発現が同時に回復した。また *suA* 変異は野生型に対し劣性をしめすことが明らかにされた。⁽¹⁰²⁾ *suA* 遺伝子は *ilv* 遺伝子に非常に近接して位置している (P13-3 により 65~68% 同時形質導入⁽¹⁰²⁾) が、*ilv* — *metE* 遺伝子間に位置するかどうかはいまだ決定されていない。

最近 Richardson らにより、*suA* 変異株の ρ 因子が変化していることが見出された⁽¹⁰⁸⁾。すなわち *su 78* (Carter と Newton により分離⁽¹⁰⁷⁾) 変異株より精製した ρ 蛋白は RNA 依存 ATPase 活性は保持しているが、転写終結活性を失っていた。また *suA amber* (Morse と Guertin により分離⁽¹⁰⁹⁾) 変異株では、 ρ 因子の活性が RNA 依存 ATPase に関し、親株に比べ 9% しか検出できなかった。これらの事実は *suA* 遺伝子と ρ 因子の間には何らかの関係があることを示唆している。ここで *nitA* 遺伝子と *suA* 遺伝子との異同が問題になる。現在までのところ最も明らかな結論は得られていないが、*nitA* 変異と *suA* 変異は同一シストロン、または同一オペロンに起きた変異と考えて矛盾しないと筆者は考えている。その根拠について、主に遺伝学的解析より得られた知見を列挙してみる。第 1 に両

遺伝子が *ilv* 遺伝子に非常に近接して位置すること。第2に *suA* *amber* 変異株では, *nitA* 変異株と同様に λ ファージ *N* 蛋白に依存しない転写が可能であること⁽¹¹⁰⁾。第3に *nitA* 702^{ts} 変異株は *suA* 変異株と同様に, 極性効果を抑制する (polarity suppressor) 活性をもつこと⁽¹¹¹⁾。第4に λ ファージ *N* 蛋白は極性効果を抑制する機能を有している⁽¹¹⁷⁾。すなわち ρ 因子に対する抗終結因子としての機能と極性効果を抑制する機能との密接な関連が考えられること。もっともこれらに対し反証と考えられるような知見もある。第1に *nitA* 18, *nitA* 83⁽¹¹¹⁾ 変異株では, 極性効果を抑制する能力をもたないこと⁽¹¹¹⁾。第2に *suA* *ori* 変異株 (Beckwithにより分離⁽¹⁰¹⁾) では, *N* 蛋白に依存しない転写が観察されな⁽¹¹¹⁾こと。第3に *nitA* ^{ts} 変異株は高温致死性であり (*nitA* 702), *nitA* *amber* 変異株は条件致死性をしめす (*nitA* 112) のに対し, *suA* *amber* 変異株はその生育に異常が見られず⁽¹⁰⁹⁾, 大腸菌の正常な増殖に *suA* 遺伝子産物は必須な因子ではないと考えられていること (しかしながら最近 この *suA* *amber* 変異株は *amber* 変異ではなく, 単なるミスセンス変異ではないかという疑問がもたれている⁽¹¹³⁾)。しかしながら 以上 3つの反証は

すべて、変異の起きた遺伝子上の位置の違い、すなわち 対立遺伝子 (allele) の違いとして説明することが可能であろう (後述参照)。

このように *nit A* 遺伝子 (ρ 因子の構造遺伝子) と *svA* 遺伝子が同一シストロン、または同一オペロン内に属するとすれば、 ρ 因子の機能を翻訳機構とも関連して考えなければならないだろう。このような観点から、極性効果に関する ρ 因子の生体内における役割、およびその作用機作として次のようなモデルが考えられる。まず ρ 因子が RNA に依存する ATPase 活性を有し、また RNA に対する強い結合能をもつ事実を重視する。すなわち ρ 因子は RNA ポリメラーゼにおいて転写された RNA の特定の塩基配列、または構造を認識することにより、ある特定の部位で転写を終結させると考える。事実我々の研究結果でも、産生 RNA が RNase により消化されつつ進む *in vitro* 転写系では ρ 因子は転写終結機能をしめさないことが知られている⁽⁹⁵⁾。しかしながら RNA が翻訳されているときはリボソームがこの ρ 因子による RNA の認識を妨げるため、シストロン内に ρ 因子が認識する塩基配列があったとしても翻訳に関する終結点でリボソームが RNA より脱落するまでは転写を終結させることはできないであろう。

このモデルによれば、極性効果は次のように説明されるであろう。シストロン内に数々の ρ 因子により認識される塩基配列が存在すると考える(実際 *in vitro* RNA 合成系における実験の結果, *lacZ*⁽⁵¹⁾, *trpE*⁽⁵²⁾ 遺伝子などでその存在が示唆されている)。もしシストロン内に生じたアンバー変異で翻訳が停止すると、リボソームが RNA より脱落し、その結果、シストロン内に存在する特定の塩基配列が ρ 因子により認識され、転写は終結するであろう。この考えによれば、極性効果におけるアンバー変異の位置効果⁽¹⁰⁶⁾ (あるシストロン内で産生 RNA の 5' 末端にアンバー変異が近ければ近いほど、強い極性効果が見られる現象をいう) は、うまく説明されるであろう。また極性効果が観察される場合、アンバー変異より下流の転写の存否について、本節冒頭で述べたようにそれぞれの立場より喧しい議論があった。本モデルによれば、シストロンはアンバー変異以降に位置する ρ 因子の作用点まで転写され、その結果産生される RNA はリボソームを伴っていないため主体内では RNase の作用を受けて速かに分解されると考えられる。事実転写の存在を主張する Morse らも、アンバー変異より下流の産物 RNA は極めて不安定であることを認めている⁽¹⁰²⁾ (もっともこの RNA は

P作用点より下流の漏出転写の結果、産生されるRNAも含むと考えられる。⁽¹¹⁴⁾後述参照)。

以上の見解を基礎に転写終結操作をまとめると、現時点では次のように統一的に理解されるであろう。DNAに保持されている転写終結部位(シグナル)がRNAポリメラーゼにより転写されRNA上に出現すると、この塩基配列を認識したP因子が直接RNAポリメラーゼを介して(この点は4-6で述べるようにRNAポリメラーゼの変異株 *nitB* の解析より遺伝学的にも強く示唆される)転写を停止させ、合成されたRNA分子を転写系から離脱させる。この際転写終結部位がP因子により認識されるか否かは、その位置が翻訳単位の外にあるか、中間にあるかにより事情は異なる。もし単位の外にある場合、すなわち先行転写されたRNA部分が既に翻訳終結点を含み、且ついまだ次の翻訳開始点が生合成されていない時期に転写終結部位が転写された場合、生成RNA上の終結塩基配列近傍にはリボソームが結合しておらず、したがってP因子はRNA上の転写終結塩基配列に作用することができる。一方転写終結部位が翻訳単位の間にある場合、すなわち翻訳終結点より上流に

位置する場合には、リボゾームの結合のため ρ 因子はこれに作用することができない。このように考えると、 ρ 因子による転写終結はかなり一般性をもち、また翻訳機構とも密接に関連していることが想像される。事実 ρ 因子の細胞内含有量はかなり多く、我々の放射免疫化学的方法による測定結果では、その分子数は RNA ポリメラーゼの約 $\frac{1}{4}$ ~ $\frac{1}{2}$ に匹敵する(全蛋白質量の約 0.2%) ことがわかった。先述のように ρ 因子は RNA 上に多くの潜在的な作用点をもち、RNA が翻訳されないときの機能が顕現化されると考えると、極性効果の場合はアンバー突然変異に起因する翻訳停止であり、したがってその厳密度は低く、漏出転写も可能であろう。実際強い極性効果が観察される場合でも、アンバー変異株においては極くわずかながら全オパロンに匹敵するサイズの RNA が検出されている⁽¹⁰²⁾。一方シストロン・オパロン末端に位置する翻訳停止機構は進化的に確立されたものばかり、その厳密度は高く ρ 因子の機能は充分に発揮されるものと考えられる。事実この場合 RNA 合成は完全に終結し、漏出転写は認められない(オパロンの転写の終結に少なくとも ρ 因子が介在することを示唆する事実として、抗 ρ 因子と考えられる入方ジン蛋白が存在すると、大

腸癌のオペロン転写が終結異常をいしめることが知られている⁽¹¹⁵⁾。

最近 *trp-lac* 融合オペロンにおいて, *trp A* 遺伝子 (*trp* オペロンの末端シストロン) が完全に発現されるにも拘らず (おそらく *trp A* 蛋白の末端は完成されていると考えられる), *lac* オペロンはトリプトファンにより調節される系⁽¹¹⁶⁾ が得られている。このことは, 転写終結点が発現停止装置以降に存在することを示唆し, 上記の考えを支持するものである。

最後に *suA* 変異と *nitA* 変異の間で見られた, 転写終結部位, 並びに極性効果に関する表現型の差違について言及しなければならぬ。転写終結点における塩基配列は基本的に ρ 蛋白の認識対象として存在するが, 同時に周辺の塩基配列によってその立体構造に差違を生ずることは可能であろう。この差違は発現を命令しない状態, あるいは系 (例えば *in vitro* 転写系) において, 野生型 ρ に対する作用点の強弱としてあらわれると考えられる⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾。一方変異型 ρ に関しては, その変異株分離の条件や手段において作用部位にまったく適した変異を選んでいるため, ρ 蛋白の変異構造においてそれぞれの作用部位に対する効果に差を生ずると考えられる。事実 ρ -*trp*-

極性効果の解除に限っても、異なる *sua* 変異がそれぞれ異なるアンバー変異に対し、さまざまな度合の解除効果を示めることが最近知られている⁽¹¹⁷⁾。

以上 ここに提出した転写終結に関するモデルの適合性は近く実証される段階にまいるものと考えられる。

4-6. 高温致死性 *nitB* 変異株の遺伝生化学的解析と結語

本論文の主題ではないが、*nitA* 変異株とは明らかに性質を異にする多くの *nit* 変異株が筆者により分離されている。そのなかで、*nitA* 変異株と同様 転写終結の機能に異常をもつ *nitB* 変異株について簡単に述べる。*nitB58^{ts}* 変異株は 30°C で λ *SusN7min5* に対し抵抗性をしめし、42°C で生育不能となる高温致死性 *nit* 変異株として分離された。*nitB58^{ts}* 変異株では、*Nit⁻* 表現型と高温致死性表現型は P1 ファージによる形質導入で分離されず、また 復帰変異株の解析から *nitB58^{ts}* 変異は単一変異であることが結論された。*nitB58^{ts}* 変異は RNA ポリメラーゼの β サブユニットの構造遺伝子変異 *nit^B*⁽¹⁴⁾ に非常に近接して位置し (P1 ファージにより) 98%

同時形質導入頻度), 野生型に対し優性を示した。この変異株について, 3-4 と同様の方法で $\lambda_{SVS} N7 N53 ptp46$ 感染後の tpo オペロンの酵素合成を調べた結果, λ フォージ N 蛋白に依存しない ASase 合成が明瞭に認められた。この N 非依存性 ASase 合成は CIP プレッシャーにより完全に抑えられた。すなわち $nitB58^{ts}$ 変異も $nitA$ 変異と同様に転写終結機能に異常をもつ結果, N 蛋白に依存しない転写が可能になったと考えられる。ASase 合成量より計算した結果 (3-4 参照), この変異株では λ フォージ P_L プロモーターから開始した転写の約 5% が全部位で正常に終結できず, 下流の遺伝子群を継続転写していることがわかった。 $nitB58^{ts}$ 変異株は高温で DNA, RNA, 蛋白合成は継続し, β ガラクトシダーゼの誘導も正常に起るが, 生存菌数は 42°C 移行後約 3 時間で減少し始めるのが観察された。この変異株より精製した RNA ポリメラーゼは, 親株のそれと比較して熱安定性が低いことがわかった。以上の結果より, $nitB58^{ts}$ 変異は RNA ポリメラーゼの転写終結機能に欠陥を主とした変異と結論される。このことは, 生体内の転写終結には ρ 因子とともに RNA ポリメラーゼも重要な役割を担っており, 転写終結機構における両者の協同作用を示唆するもの

である。

P2干渉現象を利用した *nit* 変異株の分離の方法により、大腸菌の転写調節に関与する因子の変異株を特異的に選抜できることがわかった。しかも *nit* 変異は *nitrosoguanidine* 処理により高頻度(約 10^{-3})で誘発され、変異株を容易に得ることが出来る。実際 *nitA* p *nitB* 変異株とは明らかに性質を異にする多くの *nit* 変異株を既に得ており、入子ゲノムの転写調節に幾多の大腸菌の因子が関与していることを想像させる。今後これらの *nit* 変異株について、例えば転写の開始機能に関する変異(σ因子など)の可能性も考慮しながら遺伝生化学的検索を行うことは、大腸菌の転写機構を知るための有力なアプローチの1つであろう。

謝

辞

この論文を終えるにあたり、共同研究者として 本研究を通じ、適切な指導や助言、並びに力強い激励の言葉を終始惜しまれなかった今井六雄先生、および主に生化学的解析を通じて本研究を大きく推進する原動力となられ、常に暖かく励まして下さった重定勝哉氏に深く感謝の意を表わしたいと思います。また本論文作成にあたり、丁寧に指導していただいた由良隆先生、菌株やファージ株を心良く御供与下さった永田俊夫先生、堀内嵩氏、遺伝学の基本的な技術の習熟にあたり親切にお教えいただいた和田千恵子、伊藤緝昭各氏をはじめとして、常に良き相談相手となってくださった遺伝部、化学部の皆様に厚くお礼申し上げます。最後に 洗滌、並びに試薬や培地の準備の仕事に、常に協力の労を厭われなかった、竹村富美子、小森アイ子、浅野純子各氏の御厚意に特に心から感謝します。

文 献

- (1) Jacob, F., Monod, J. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 193 (1961)
- (2) Jacob, F., Monod, J. : J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)
- (3) Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C. G., Risebrough, R. W., Watson, J. D. : Nature 190, 581 (1961)
- (4) Volkin, E., Astrachan, L. : In the Chemical Basis of Heredity p.686. Baltimore : Johns Hopkins Press. (1957)
- (5) Wilcox, G., Clemetson, K. J., Santi, P. V., Engelsberg, E. : Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. 68, 2145 (1971)
- (6) Contesse, G., Gros, F. : Acad. Sci. Paris 266, 262 (1968)
- (7) Hayward, W. S., Green, M. H. : Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. 64, 962 (1969)
- (8) Chen, B., Crombrugghe, B. de., Anderson, W. B., Gottesman, M. E., Pastan, I., Perlman, R. L. : Nature New Biol. 233, 67 (1971)
- (9) Gilbert, W., Maxam, A. : Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. 70, 3581 (1973)
- (10) Maniatis, T., Ptashne, M., Burrell, B. G., Donelson, J. E. : Nature 250, 394 (1974)
- (11) Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., Bautz, E. K. F., : Nature 221, 43 (1969)

- (12) Krakow, J.S., Paley, K., Karsdat, M.: Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 62, 432 (1969)
- (13) Traverse, A.A.: Nature New Biol. 229, 69 (1971)
- (14) Heil, A., Zillig, W.: FEBS Letters 11, 165 (1970)
- (15) Iwakura, Y., Ishihama, A., Yura, T.: Molec. gen. Genet. 121, 181 (1973)
- (16) Anderson, W., Schneider, A., Emmer, M., Perlman, R., Pastan, I.: J. Biol. Chem. 246, 5959 (1970)
- (17) Zubay, G., Schwartz, D., Beckwith, J.: Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 66, 104 (1970)
- (18) Gilbert, W., Müller-Hill, B.: Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 56, 1891 (1966)
- (19) Nakanishi, S., Adhya, S., Gottesman, M.E., Pastan, I.: Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 70, 334 (1973)
- (20) Ptashne, M.: Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 57, 306 (1967)
- (21) Steinberg, R., Ptashne, M.: Nature New Biol. 230, 76 (1971)
- (22) Greenblatt, J., Schleif, R.: Nature 231, 166 (1971)
- (23) Davison, J., Pilariski, L.M., Echols, H.: Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 63, 168 (1969)

- (24) Cukier - Kahn, R., Jaquet, M., Gros, F. : Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. 69, 3463 (1972)
- (25) Makadiah, S. P., Srinivasan, P. R. : Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. 68, 1898 (1971)
- (26) Ghosh, S., Echols, H. : Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. 69, 3660 (1972)
- (27) Inoko, H., Naito, S., Ito, K., Imai, M. : Molec. gen. Genet. 129, 37 (1974)
- (28) Reznikoff, W. S., Miller, J. H., Scaife, J. G., Beckwith, J. : J. Mol. Biol. 43, 201 (1969)
- (29) Roberts, J. W. : Nature 224, 1168 (1969)
- (30) Roberts, J. W. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 121 (1970)
- (31) Burgi, E., Hershey, A. D. : Biophys. J. 3, 309 (1963)
- (32) Radding, C. M., Echols, H. : Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. 60, 707 (1968)
- (33) Ogawa, T., Tomijawa, J. : J. Mol. Biol. 35, 217 (1968)
- (34) Brachet, P., Eisen, H., Rambach, A. : Molec. gen. Genet. 108, 266 (1970)
- (35) Heineman, S. F., Spiegelman, W. G. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 315 (1970)

- (36) Kumar, S., Calef, E., Szybalski, W.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 331 (1970)
- (37) Kowalsky, P., Bourguignon, M.F., Bouquet, M., Gros, F.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 305 (1970)
- (38) Portier, M., Marcand, L., Cohen, L., Gros, F.: Molec. gen. Genet. 117, 72 (1972)
- (39) Luzzati, D.: J. Mol. Biol. 49, 515 (1970)
- (40) Franklin, N.C.: The Bacteriophage Lambda (A. Hershey, ed.), p. 621. New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1971
- (41) Szybalski, W., Bøvre, K., Fianndt, M., Hayes, S., Hradecna, Z., Kumar, S., Lozeron, H.A., Nijkamp, H.J., Stevens, W.F.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 341 (1970)
- (42) Damhly, C., Couturier, M., Thomas, R.: J. Mol. Biol. 32, 67 (1968)
- (43) Dove, W.F.: J. Mol. Biol. 19, 187 (1966)
- (44) Sly, W.S., Ebersole, H., Adler, J.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 53, 378 (1965)
- (45) Takeda, Y., Oyama, Y., Nakajima, K., Yura, T.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 533 (1969)
- (46) Georgopoulos, C.P.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 68, 2477 (1971)

- (47) Ghyzen, A., Pironio, M.: J. Mol. Biol. 65, 259 (1972)
- (48) Friedman, D. I., Jolly, C. T., Mural, R. J.: Virology 51, 216 (1973)
- (49) Friedman, D. I., Biron, L. S.: Virology 58, 141 (1974)
- (50) Shimizu, N., Hayashi, M.: J. Mol. Biol. 54, 315 (1974)
- (51) Crombrughe, B. de, Adhya, S., Gottesman, M., Prast, I.: Nature New Biol. 241, 260 (1973)
- (52) Richardson, J. P.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 127 (1970)
- (53) Dunn, J., Studier, F.: Proc. Nat. Acad. Sci, U. S. 70, 1559 (1973)
- (54) Takanami, M., Okamoto, T., Sugimura, M.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 179 (1970)
- (55) Lowery - Goldhamer, C., Richardson, J. P.: Proc. Nat. Acad. Sci, U. S. 71, 2003 (1974)
- (56) Fukuda, R., Iwakura, Y., Ishihama, A.: J. Mol. Biol. 83, 353 (1974)
- (57) Yang, H., Zubay, G.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 725 (1974)
- (58) Bertani, G.: Advanc. Virus Res. 5, 151 (1958)

- (59) Lindahl, G., Sironi, G., Bialy, H., Calender, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 66, 587 (1970)
- (60) Zissler, J., Signer, E., Schaefer, : *The Bacteriophage Lambda* (A. Hershey ed.). p.469. New York : Cold Spring Harbor Laboratory 1971
- (61) Cohen, S.N., Chang, A.C.Y.: *Virology* 46, 397 (1971)
- (62) Court, D., Sato, K.: *Virology* 39, 348 (1968)
- (63) Mark, K.: *Molec. gen. Genet.* 124, 291 (1973)
- (64) Frandt, M., Hradečna, Z., Lozeron, H. A., Szykalski, W.: *The Bacteriophage Lambda* (A. Hershey ed.). p.329. New York : Cold Spring Harbor Laboratory 1971
- (65) Butler, B., Echols, H.: *Virology* 40, 212 (1970)
- (66) Taylor, A.L., Trotter, C.D.: *Bact. Rev.* 36, 504 (1972)
- (67) Vogel, H.J., Bonner, D.M.: *J. Biol. Chem.* 248, 47 (1956)
- (68) Lennox, E.S.: *Virology* 1, 190 (1955)
- (69) Lederberg, J.: *Methods in medical research* (Comroe, J.H., Jr. ed.), vol. 3, p.3. Year Book Publishers, Chicago 1950
- (70) Yamamoto, K., Alberto, B.M., Benzinger, R., Lowhorne, L., Treiber, G.: *Virology* 40, 734 (1970)
- (71) Gibson, M.I., Gibson, F.: *Biochem. J.* 90, 248 (1964)

- (72) Calender, R. : Ann. Rev. Microbiol. 24, 242 (1970)
- (73) Echols, H. : Ann. Rev. Genet. 6, 157 (1972)
- (74) Herskowitz, I. : Ann. Rev. Genet. 7, 289 (1973)
- (75) 重定 勝哉 未公表
- (76) Horiuchi, T., Nagata, T. : Molec. gen. Genet. 123, 89 (1973)
- (77) Nagata, T., Horiuchi, T. : Molec. gen. Genet. 123, 77 (1973)
- (78) Inoko, H., Imai, M. : Molec. gen. Genet. 129, 49 (1974)
- (79) Pero, J. : Virology 40, 65 (1970)
- (80) Oppenheim, A., Honigman, A., Oppenheim, A. B. :
Virology 61, 1 (1974)
- (81) Signer, E. R. : Nature 223, 158 (1969)
- (82) Lieb, M. : J. Virol. 6, 218 (1970)
- (83) Kaiser, D. : The Bacteriophage Lambda (A. Hershey ed.).
p.195. New York : Cold Spring Harbor Laboratory (1971)
- (84) Pereira da Silva, L. H., Eisen, H. A., Jacob, F. : Acad. Sci.
(Paris) 266, 926 (1968)
- (85) Sly, W. S., Eisen, H. A., Siminovitch, L. : Virology 34,
112 (1968)
- (86) Butler, B., Echols, H. : Virology 40, 212 (1970)

- (87) Pereira da Silva, L. H., Jacob, F. : Ann. Inst. Pasteur 115, 145 (1968)
- (88) Oeschger, M. R., Berlyn, M. K. B. : Molec. gen. Genet. 134, 77 (1974)
- (89) 米原伸, 旗子英俊 未公表
- (90) Kelly, B. : Virology 19, 32 (1963)
- (91) Chadwick, P., Pirrotta, V., Steinberg, R., Hopkins, N., Ptashne, M. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 283 (1970)
- (92) Steinberg, R. A., Ptashne, M. : Nature New Biol. 230, 76 (1971)
- (93) Pero, J. : The Bacteriophage Lambda (A. Hershey ed.), p. 599. New York : Cold Spring Harbor Laboratory 1971
- (94) Sly, W. S., Rabideau, K., Kalber, A. : The Bacteriophage Lambda (A. Hershey ed.) p. 575. New York : Cold Spring Harbor Laboratory 1971
- (95) Koga, H., Horiuchi, T. : Jap. J. Genet. 46, 285 (1971)
- (96) Matsubara, K. : Virology 55, 713 (1972)
- (97) Franklin, N. C. : J. Mol. Biol. 81, 33 (1974)
- (98) Calender, R., Lindqvist, B., Sironi, G., Clark, A. : Virology 40, 172 (1970)

- (99) Yokota, T., Goto, J.S. : J. Bact. 103, 513 (1970)
- (100) Soll, L., Berg, P. : Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 63, 392 (1969)
- (101) Beckwith, J. : Biochim. Biophys. Acta. 76, 162 (1963)
- (102) Morse, D.E., Primakoff, P. : Nature 226, 28 (1970)
- (103) Hirsh, H.J., Starlinger, P., Brachet, P. : Molec. gen. Genet. 119, 191 (1972)
- (104) Malamy, M.H., Fiandt, M., Szykalski, W. : Molec. gen. Genet. 119, 207 (1972)
- (105) Kuwano, M., Schlessinger, D., Morse, P.E. : Nature New Biol. 231, 214 (1971)
- (106) Imamoto, F., Kano, Y., Tani, S. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 471 (1970)
- (107) Carter, T., Newton, A. : Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 68, 2962 (1971)
- (108) Richardson, J.P., Grimley, C., Lowery, C. : Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 72, 1725 (1975)
- (109) Morse, D.E., Guertin, M. : J. Mol. Biol. 63, 625 (1972)
- (110) Brunel, F., Davison, J. : Molec. gen. Genet. 136, 107 (1975)
- (111) 猪子 英俊 未公表
- (112) Segawa, T., Imamoto, F. : J. Mol. Biol. 87, 741 (1974)

- (113) Gottesman, M.E. 未公表
- (114) Hiraga, S., Yanofsky, C. : J. Mol. Biol. 72, 103 (1972)
- (115) Adhya, S., Gottesman, M., Crombrughe, B. de : Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 71, 2534 (1974)
- (116) Mitchel, D.H., Reznikoff, W.S., Beckwith, J. : J. Molec. Biol. 93, 331 (1975)
- (117) Yanofsky, C. 未公表
- (118) Cerdá - Olmedo, E., Hanwalt, P. C., Guerola, N. :
J. Molec. Biol. 33, 705 (1968)
- (119) 重定勝哉, 猪子英俊, 今井六雄, 未公表