

## 枯草菌におけるDNA-細胞膜複合体について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8715">http://hdl.handle.net/2297/8715</a>

## 枯草菌における DNA-細胞膜複合体について

金沢大学がん研究所 生物物理部 (主任: 吉川 寛教授)

豊田 裕夫

(昭和53年3月24日受付)

染色体複製の制御機構を解析する上で、細胞表面の果たす役割は、重要な因子の一つと考えられる。

染色体と、細胞膜が、染色体上の特定部位で、結合していることは、枯草菌、および大腸菌を用いて証明されている。枯草菌では、染色体上の複製起点<sup>1)-5)</sup>、複製点<sup>3)4)6)</sup>、および複製終点<sup>1)-3)7)8)</sup>で、大腸菌では、複製点<sup>9)10)</sup>、および複製終点<sup>1)11)12)</sup>で、細胞膜と結合していることが、生化学的に、証明されている。また、電子顕微鏡を用いた形態学的観察からも証明されている<sup>13)</sup>。

以来、染色体複製に関与する細胞膜たんぱくの同定に関する研究が数多くなされてきた。これらの研究は、大別して二つに分けられる。

i) DNA合成変異株<sup>14)-16)</sup>、あるいは種々のDNA合成阻害剤<sup>17)18)</sup>を用いて、DNA合成を阻害し、膜たんぱくの変動を調べる。

大腸菌においては、dnaAあるいはdnaBと称されている、DNA合成変異株を用いて、検討された。dnaB<sup>15)</sup>では、DNA合成非許容温度下、分子量30,000、および40,000の膜たんぱくに変動が認められ、dnaA<sup>16)</sup>では、分子量60,000の膜たんぱくに変動が認められている。

枯草菌<sup>17)</sup>では、合成変異株を用いた実験から非許容温度下、分子量50,000および30,000の膜たんぱくに変動が認められたと報告している。

DNA合成阻害剤を用いた実験としては、大腸菌において、nalidixic acidを用いて阻害すると分子量40,000の膜たんぱくの増加を認めたという報告がある<sup>18)</sup>。この分子量40,000の膜たんぱくは、Inouye & Pardee<sup>14)</sup>によりProtein Xと名付けられている。

また、大腸菌の外膜にある分子量80,000のたんぱくが、複製の開始に関与しているという報告もある<sup>17)</sup>。

ii) DNA-細胞膜複合体を単離し、複合体特有のたんぱくを同定する。

この分野の研究として、Olsen等<sup>19)20)</sup>は、大腸菌か

ら、free flow電気泳動法を用いて、複合体を単離・精製し、たんぱくを同定した。その結果、分子量80,000のたんぱくが、複合体に濃縮されると報告している。また、Portalier & Worcel<sup>21)</sup>は、bromodeoxyuridineでDNA中のthymineを置換したDNAを用いて、大腸菌から、ヌクレオイドを単離し、UV照射後、DNase処理して、DNAと共有結合している膜たんぱくのみを精製し、同定を行なった。その結果、分子量80,000、および56,000のたんぱくが、DNAと特異的に結合するたんぱくであると報告している。

枯草菌では、Sueoka & Hammers<sup>5)</sup>により、分子量35,000、28,000、22,000、および15,000の4種が、Harmon & Taber<sup>16)</sup>により、125,000、57,000および42,000のたんぱくが複合体特有のたんぱくであると報告されている。

(i)(ii)の研究から、細胞膜が、染色体の複製制御に積極的な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら、染色体と細胞膜の結合の化学的性状、結合の果たす役割について、分子レベルでの研究は、非常に遅れている。これは、主として、“DNA-細胞膜複合体”の単離・精製法が確立していないことによると思われる。複合体の単離法には、次の三つの方法が代表的であり、これまで広く用いられてきた。

(i) 蔗糖密度勾配超遠心法：細胞膜に結合したDNAと結合していないDNAでは、その大きさが異なることを利用して、蔗糖密度勾配超遠心を行なった際、速く沈降する画分を“DNA-細胞膜複合体”として単離する方法<sup>1)3)6)10)11)</sup>。

(ii) M<sup>-</sup>バンド法：細胞膜に結合したDNAと結合していないDNAでは、Mg<sup>2+</sup>-Sarkosylの結晶に対する親和性が異なることを利用して複合体を単離する方法<sup>6)22)</sup>。

(iii) 塩化セシウム-蔗糖重層勾配超遠心法：(i)の方法で、まず、速く沈降する画分を単離し、この画分

を、更に塩化セシウム-蔗糖重層勾配遠心法を用いて、密度の差を利用して、DNA 非結合性膜成分を、DNA-細胞膜複合体から分離する方法<sup>9)</sup>。

しかしながら、(i)(ii)共に、DNA に結合していない、非特異的な膜断片が、複合体中に混入し、これを除去出来ない。また(ii)では、界面活性剤を用いているため、細胞膜の構成成分におよぼす影響を無視出来ない。(iii)では、塩化セシウムを用いるため、高塩下で、複合体から、DNA 結合性たんぱくが解離する可能性がある。

著者は、複合体の持つ役割、結合の実体を分子レベルで解析するために、まず複合体の精製法を確立することを目的として、本研究を行なった。

精製複合体が得られたか否かは、次の二つの観点から確認することにした。

(i) 複合体を出来るだけ温和な条件下で単離し、さらに、複合体は、DNA と特異的に結合している膜成分のみを含むこと。

(ii) 精製複合体は、染色体上の特定部位を含むこと。

この様な観点から、以下に述べる方法を用いて、複合体の単離・精製を行なった。

DNA に結合している細胞膜と、結合していない細胞膜では、その表層荷電が異なることを利用して、ゾーン電気泳動法を用いて両者を分離した。

次に、電気泳動のみでは分離出来なかった細胞膜に結合した DNA と、結合していない DNA は、その大きさの異なることを利用し、蔗糖密度勾配超遠心により両者を分離した。

この様にして得られた、精製複合体は、染色体上の複製開始部位のみを含み、更に、複合体特有の数種の膜たんぱく成分が同定出来た。

### 実験材料および方法

#### I. 使用菌株

1. *Bacillus subtilis* 168 LTT  
要求性：leucine, tryptophan, thymine.

2. *Bacillus subtilis* CRK 3000  
要求性：leucine, methionine, adenine,

histidine.

#### II. 培地

1. Low phosphate Penassay (LP)

Bacto Beef Extract 1.5g, Bacto Yeast Extract 1.5g, Bacto Peptone 5.0g, NaCl 3.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 140mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60mg を蒸留水に溶解し、Tris-HCl (最終濃度 0.1M) で、pH を 7.3 に調整し、全量を 1l

とした。

2. Cg (Spizizen's Minimal Medium)<sup>23)</sup>

3. LowS-CG-AA enriched medium

<sup>35</sup>S を用いて、たんぱくを標識するため Cg 中の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, および casein hydrolysate を NH<sub>4</sub>Cl (1.62g/l), MgCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O (165mg/l), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (8.86mg/l, 2μg S atom) にかえ、13 種アミノ酸 (ala., arg., asp., gly., his., ile., lys., phe., pro., ser., thr., および val. 最終濃度 20μg/ml) を添加した。

さらに、増殖促進のため、4 種類の塩基 (cytosine, adenine, guanine, および uracil を最終濃度 20μg/ml), vitamine 類 (thiamine-HCl, riboflavin, p-aminobenzoic acid, nicotinamide, Ca-pantothenate, pyridoxine-HCl, および folic acid 1μg/ml choline bitartrate および inositol 2μg/ml, biotin 0.1μg/ml) を添加した。

#### III. 緩衝液

1. TKE<sub>1</sub>

20mM Tris-HCl, 0.1M KCl, 1mM EDTA, pH8.1, EDTA 濃度を 10mM にした場合 TKE<sub>10</sub> と表示する。

2. P<sub>50</sub>E<sub>10</sub>

50mM Na-phosphate, 10mM EDTA, pH6.7.

#### IV. 試薬

1. H<sub>3</sub> <sup>32</sup>PO<sub>4</sub> : carrier free, 第一化学薬品株式会社製

2. H<sub>2</sub> <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> : carrier free, 第一化学薬品株式会社製

3. [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine (<sup>3</sup>H-TdR) : 5 Ci/mmmole, Radichemical Centre, Amersham.

D- [1-<sup>3</sup>H] glucosamine hydrochloride : 3 Ci/mmmole, Radiochemical Centre, Amersham.

#### V. 実験方法

1. 粗 DNA-細胞膜複合体の調製<sup>8)</sup>

*B. subtilis* 168 LTT を LP 又は LowS-CG-AA enriched medium 中、37°C で培養した。対数増殖期中期 (Klett Unit 40 ~ 50) で NaN<sub>3</sub> (25mM) を用いて増殖をとめ、急冷後、メンブレンフィルター (Millipore, pore size 0.45μ) を用いて、ろ過後、1/50 容の TKE<sub>1</sub> (pH8.1), 25mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1mM EDTA に懸濁し、lysozyme (1mg/ml) を加え、34°C で、数分処理し細胞を溶菌後、溶菌液を、径 1.2mm の注射針中を 10 回通し、DNA を切断した。

この溶菌液を、64% 蔗糖-TKE<sub>1</sub> (pH8.1) 溶液を底においた、5-20% 蔗糖-TKE<sub>1</sub> 溶液を段階的に積層し

た蔗糖密度勾配上に重層し、遠心 (Beckman SW27 rotor, 20,000 rpm, 2°C, 45min) した。遠心後、チューブの上から、2 ml ずつ 15 本に分画し、分画番号 11 番から 14 番までを、“粗 DNA-細胞膜複合体”とした。

## 2. 蔗糖密度勾配ゾーン電気泳動

ゾーン電気泳動に用いた装置は、Kadoya 等に<sup>24)</sup>より開発された装置を用いた。

V-1 で得た、粗 DNA-細胞膜複合体を、P<sub>50</sub>E<sub>10</sub> (pH6.7) 緩衝液に対して、一晚透析後、Sephadex G-50 粉末を用いて、3~4 ml まで濃縮した。

濃縮した試料の蔗糖濃度を 5% にし、1/10 容の、0.05% BPB を加え、70% 蔗糖-P<sub>50</sub>E<sub>10</sub> 溶液を底におき、10~30% 蔗糖-P<sub>50</sub>E<sub>10</sub> の直線的蔗糖密度勾配上に、重層し、定電圧 (20mA)、9~10 時間、4°C で、電気泳動を行なった。泳動後、底から、20 滴ずつ分画し、形質転換活性および、放射能活性を測定した。

## 3. 形質転換活性測定<sup>25)</sup>

試料より一定量とり、CRK 3,000 を受容菌として、形質転換活性を測定した。

## 4. 放射能活性測定

DNA は、1N KOH で、37°C 一晚処理後、1N HCl で中和し、10% 冷 TCA を加え、TCA 不溶性沈澱を、Glass fibre filter (Whatman, GF/C) 上に集め、トルエン PPO シンチレーターを用いて、放射能活性を測定した。

たんぱく、およびグルコサミンは、直接 10% 冷 TCA を加え、同様の方法で放射能活性を測定した。

リポドは、<sup>32</sup>P で標識した試料から、Bligh & Dyer<sup>26)</sup>の方法に従って抽出し、CHCl<sub>3</sub> 層をバイアルに入れ、一晚乾燥後、トルエン-PPO シンチレーターを用いて、放射能活性を測定した。

## 5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ゲル電気泳動は、Laemmli & Favre<sup>27)</sup>の方法を用いた。

泳動前に、分画した試料を濃縮するため、各画分を、carrier DNA (calf thymus DNA 2mg/ml を一滴加えた) と共に、10% 冷 TCA で沈澱後、アセトンで洗浄し、残存する TCA を除いた。

沈澱を、40~50 μl の緩衝液 (62.5mM Tris-HCl, 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, pH6.8) に懸濁し 100°C, 2 分間処理して、沈澱を完全に溶解後、1/10 容の、0.05% BPB-80% 蔗糖溶液を加え、10% ゲル濃度、定電圧 (20mA)、4~5 時間室温で泳動を行なった。泳動後 0.1% Coomassie Brilliant Blue-50% TCA 溶液中で、20 分染色後、7.5% 酢酸

で脱色し、ゲルを乾燥後、Bonner & Lasky<sup>28)</sup>の方法でオートラジオグラフィを行ないたんぱく成分を解析した。

## 6. 電子顕微鏡観察

ゾーン電気泳動法により、単離した複合体を、0.1% グルタルアルデヒド溶液で 30°C, 30 分処理し固定した。試料中の蔗糖、およびグルタルアルデヒドを除くため、P<sub>50</sub>E<sub>10</sub> (pH6.7) 緩衝液に対して透析した。試料を、Davis 等<sup>29)</sup>の方法により展開し、既に報告した方法<sup>30)</sup>を用いて観察した。

## 実験結果

### I. DNA-細胞膜複合体の精製

*B. subtilis* 168 LTT を合成培地中で培養し、実験方法 V-1 で述べた方法に従って溶菌液を調製した。溶菌液を調製する際、DNA 断片の細胞膜への非特異的巻きこみを防ぐため、アルカリ性の緩衝液 (TKEI, pH8.1) で調製した。溶菌液を、5~20% の蔗糖を段階的に積層した蔗糖密度勾配遠心により分画し、重い画分に来るものを、“粗 DNA-細胞膜複合体”とした (Fig.1.)

粗 DNA-細胞膜複合体を、直ちに P<sub>50</sub>E<sub>10</sub> (pH6.7) 緩衝液に対して透析しゾーン電気泳動を行なった。以下に示す様に、粗 DNA-細胞膜複合体を中性溶液に對

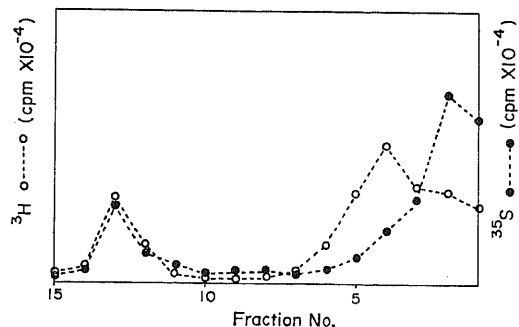


Figure 1. 粗 DNA-細胞膜複合体の調製

*B. subtilis* 168 LTT を thymidine (2.5 μg/ml), leucine (50 μg/ml) tryptophane (50 μg/ml), 0.5% glucose を含む合成培地, Lows-CG-AA enriched medium 中 37°C で培養した。細胞内の DNA およびたんぱくは、それぞれ、<sup>3</sup>H-TdR (2.5 μCi/2.5 μg/ml), <sup>35</sup>S (1.5 μCi/2 μg S atom/ml) で標識した。Klett Unit 40~50 で増殖を NaNO<sub>3</sub> (25mM) で止め、“実験方法 V-1”に従って溶菌液を調製し、蔗糖密度勾配遠心を行ない分画後、各分画より 20 μl をとり放射能活性を測定した。分画番号 11 番より 14 番までを集めて、さらに精製を行なった。

して透析することが、複合体の精製には重要である。

ゾーン電気泳動、さらに複合体を精製するため再び電気泳動を行なった時のパターンを Fig.2 (a), Fig.2 (b) に示した。再び電気泳動を行なったも、DNA とたんばくのパターンは一致しなかった。これは、粗複合体中にある、細胞膜に結合していない DNA によると思われる。細胞膜に結合した DNA と、結合していない DNA を分離するために、電気泳動後、複合体画分を集めて、蔗糖密度勾配遠心を行なった (Fig.2 (c))

Fig.2 (c) に示した様に、*purA* マーカーと *hisA* マーカーでは、活性の分布が異なる。*purA* マーカーは、枯草菌染色体上で、複製開始部位近傍に位置し、*hisA* マーカーは、複製開始点と複製終点とのほぼ中間に位置するマーカーである。遠心後、*purA* マーカーの複合体からの遊離は認められなかったが、*hisA* マーカーは、大部分の DNA と同様、複合体からの遊離が認められた。この事は、超遠心により、膜に結合した DNA と膜に結合していない DNA を分離出来ることを示している。

電気泳動を用いることにより、粗 DNA-細胞膜複合体から、DNA に結合していない膜成分を 80 ~ 90 % 除くことが出来た。さらに、超遠心を併用することにより、複合体から、膜に結合していない DNA を 50 % 以上除くことが出来た。

また、精製複合体は、複製開始部位近傍に位置する遺伝子マーカー *purA* 特異的に濃縮する。しかし、複製終点近傍に位置するマーカー *metB* は、僅かしか濃縮されなかった (Table 1)。

## II. 精製した複合体の諸性質

### 1. 複合体の電子顕微鏡観察

精製した複合体を、“実験方法 V-6” で述べた方法に従い、電子顕微鏡観察を行なった。

Fig.3. に示した図は、これまで報告されている複合体の図に類似していた。中央に見られる膜様の物に、1 ~ 3 本の DNA 断片が附着しており、その長さは、約 10 ~ 15  $\mu\text{m}$  であった。長さから、DNA の分子量を計算すると、約  $2 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$  であった。

### 2. 複合体の構成成分

細胞内の DNA、たんばく、P-リピド、および細胞壁成分をそれぞれ、 $^3\text{H}$ -TdR、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、および、 $^3\text{H}$ -Glucosamine で標識し、複合体中に含まれるこれら諸成分の割合を、各精製の段階毎に求め、Table 2 に結果をまとめた。

表中の欄 2 と 3 からわかるように、“大きさ”の差のみを用いたこれまでの複合体の単離法では分離出来な

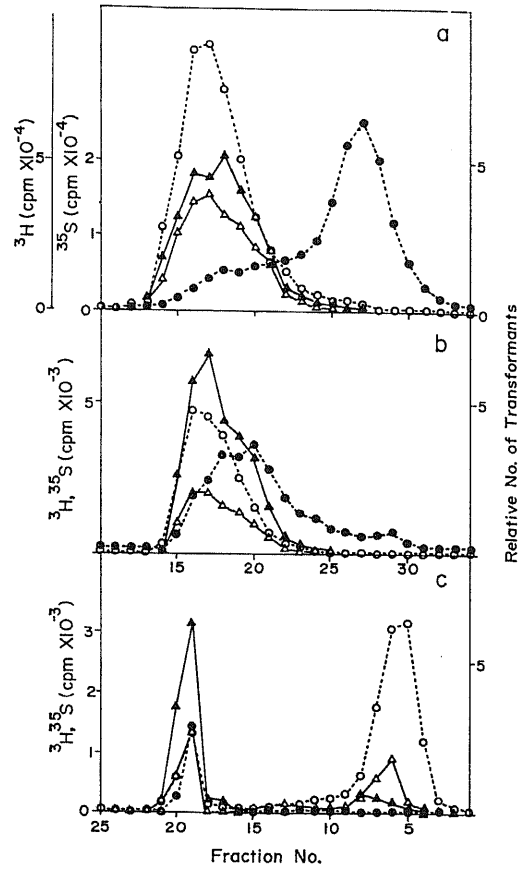


Figure 2. ゾーン電気泳動を用いた、複合体の精製。

Fig.1 で得られた、粗複合体を、 $\text{P}_{50}\text{E}_{10}$  (pH6.7) 緩衝液に対し透析し、濃縮後、“実験方法 V-2” で述べた方法に従って電気泳動を行なった (a)。分画番号 16 番から 19 番までを集めて、再び電気泳動を行なった (b)。 (b) と同様 (a) の 16 番より 19 番までを集めて、64% 蔗糖- $\text{P}_{50}\text{E}_{10}$  溶液を底においた、10 ~ 30% 蔗糖- $\text{P}_{50}\text{E}_{10}$  溶液の直線的密度勾配遠心を行なった (Beckman SW27 rotor, 25,000rpm, 4hrs,  $2^\circ\text{C}$ )。遠心後、1.2ml ずつ、分画した (c)。

(a), (b), (c) において、各分画より一定量とり、それぞれについて、形質転換活性および、放射能活性を測定した。

○-----○,  $^3\text{H}$ -radioactivity ; ●-----●,  $^{35}\text{S}$ -radioactivity ; (a), ▲——▲, *purA* ( $1 = 1 \times 10^5$  transformants/ml) ; △——△, *hisA* ( $1 = 5 \times 10^3$  transformants/ml) ; (b), ▲——▲, *purA* ( $1 = 1 \times 10^5$  transformants/ml) ; △——△, *hisA* ( $1 = 5 \times 10^3$  transformants/ml) ; (c), ▲——▲, *purA* ( $1 = 5 \times 10^3$  transformants/ml) ; △——△, *hisA* ( $1 = 2 \times 10^3$  transformants/ml)。

かった DNA に結合していない膜成分を電気泳動法により、約 80% 以上除くことが出来た。

また、この精製複合体は、細胞表面成分であるリピド、およびグルコサミンをそれぞれ全細胞中の 0.4%、1.0% 含んでいる。

電子顕微鏡観察、および構成成分の解析から、著者の方法により単離・精製した複合体は、DNA に結合した細胞膜のみを含み、さらに、DNA 上の特定部位のみを濃縮した複合体である。

### 3. 染色体複製開始部位と細胞膜との結合におよぼす pH の影響

細胞膜に結合した DNA と結合していない DNA は、電気泳動後、遠心することにより完全に分離出来た。即ち、大部分の DNA と同様に、*hisA* マーカーは複合体から遊離する。これに反して、*purA* マーカーの複合体からの遊離は認められなかった。しかしながら、電気泳動を、アルカリ性で行なった後、アルカリ性で、遠心すると、*purA* マーカーの複合体からの遊離が認められた。そこで、*purA*-DNA の細胞膜との結合にお

よぼす pH の影響について検討した。

何れの pH においても、泳動のパターンに変化はなかった (Fig. 4 (a,c,e))。しかし、pH がアルカリ性になるにつれて、遠心すると、*purA* マーカーが複合体から遊離する (Fig. 4 (b,d,f))。

遊離の度合は、pH 8.1 において、pH 6.7 の場合に比較すると、50% 以上になった。

粗複合体を、中性溶液に対して透析した場合、この様な遊離が認められず、アルカリ性に透析すると認められることから、中性における、*purA*-DNA と細胞膜との結合は不可逆的と思われる。

若しそうであるならば、一度中性に透析し安定化した複合体を、アルカリ性に対して透析後、電気泳動、遠心を行なっても、*purA* の複合体からの遊離は認められないはずである。結果は、予想した通り、*purA* マーカーの遊離は認められなかった (Fig. 5)。以上の結果を、Table 3. にまとめた。

### 4. SDS-ポリアクリルアミドゲルによるたんぱく成分の解析

Table 1. Marker frequency analysis of a purified complex

	Marker frequency (normalized)	
	<i>purA/hisA</i>	<i>metB/hisA</i>
sheared whole lysate	3.57	0.57
1st SDG	28.3	1.73
1st SDE	28.3	1.73
2nd SDG after 1st SDE	39.6	2.10

精製過程における複合体中の各マーカーの遺伝子頻度を測定した。値はすべて、胞子 DNA の *purA/hisA* = 1.01, *metB/hisA* = 0.6 で補正した。SDG (蔗糖密度勾配超遠心)、SDE (蔗糖密度勾配電気泳動)

Table 2. Properties of a purified DNA-membrane complex

	Relative amount (%)			
	DNA	protein	lipid	wall
sheared whole lysate	100	100	100	100
1st SDG	6.2	6.5	12.1	7.4
1st SDE	6.2	1.4	0.4	1.0
2nd SDG after 1st SDE	1.5	1.4	—	—

精製複合体中の、DNA、たんぱく、リピドおよび細胞壁成分を、各精製過程毎に、細胞内の全量に対する相対値で示した。

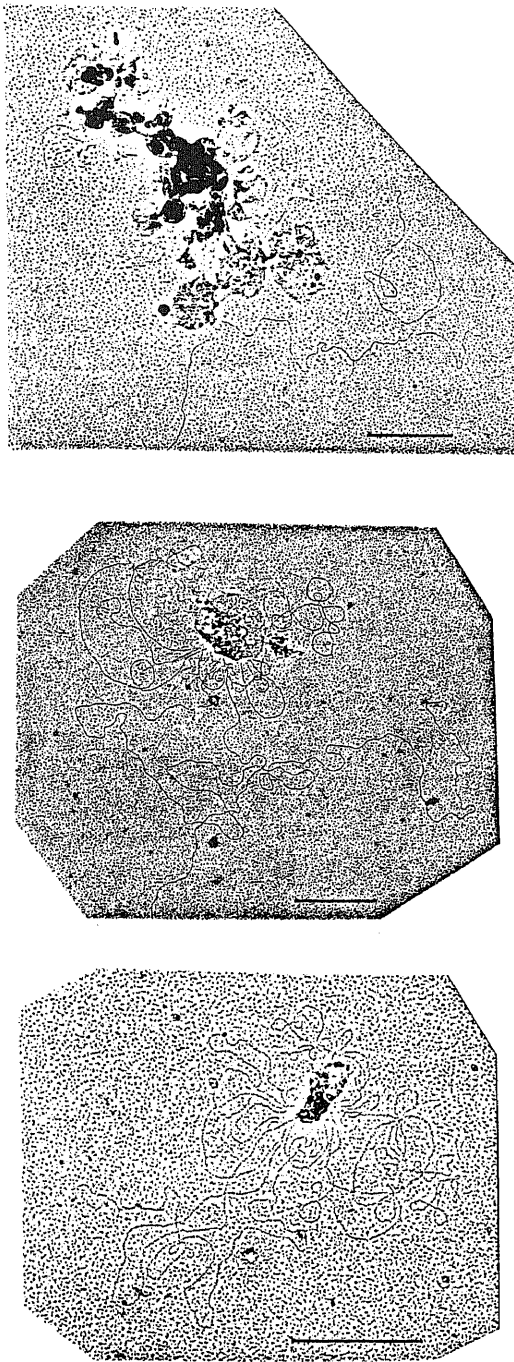


Figure 3. 精製した複合体の電子顕微鏡観察  
 Fig.2 で得られた、複合体分画を集め、V-6 で述べた方法に従って電子顕微鏡観察を行なった。— = 1 $\mu$ m

精製した複合体中に、特異的たんぱく成分があるかどうか、SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて、解析した。

複合体は、殆んど主要な膜たんぱく成分を含んでいた。

Fig.6 (a,b) に示した様に、複合体画分と、DNA に結合していない膜画分では、複合体画分のたんぱく量が、全細胞中の 1~3% という少量にも拘わらず差異が認められなかった。一般に、細胞膜たんぱくは、全細胞中のたんぱくの 10% 前後と言われており、この事からも複合体が含むたんぱく量は少ないことが解る。ところが、たんぱく成分は差異がなかった。このことから、複合体中の DNA と特異的に結合している膜たんぱくは非常に少量のたんぱくであることが予想される。そこで、大多数の膜たんぱくを除くため、細胞溶菌液を超音波処理した後、電気泳動を行なった。30 秒、60 秒、超音波処理後、泳動すると、複合体画分のたんぱく量は、それぞれ、全細胞中のたんぱく量の 0.07%、0.03% であった。

この様に、超音波処理により、大多数のたんぱくを除いた後、たんぱく成分を解析したところ、予想の通り、いくつかの、複合体特有のたんぱく成分が検出された。これらのたんぱく成分は、分子量 150,000、38,000、32,000、29,000、27,000、24,000 であった。この内、38,000、32,000 のたんぱくは、60 秒処理で、消失した。また、150,000 のたんぱくは、RNA ポリメラーゼの、 $\beta$ 、 $\beta'$  サブユニットと思われる。この結果分子量 29,000、27,000、24,000 を持つたんぱく成分が、複合体中の DNA と強固に結合しているたんぱくと思われる。

#### 考 察

染色体 DNA が、細胞膜と、DNA の複製部位で結合していることを枯草菌では、Ganesan & Lederberg<sup>6)</sup> により、大腸菌では、Smith & Hanawalt<sup>12)</sup> により発見されて以来、数多くの研究がなされてきたが、結合の化学的性状に関しては、不明な点が多い。このことは、複合体の単離・精製法が、まだ確立していないことによるとと思われる。

著者は、複合体の単離・精製法の確立を試み、中性の条件で、電気泳動、および蔗糖密度勾配遠心を併用することにより、安定な複合体を精製することが出来た。

精製した複合体は、複製開始部位近傍の遺伝子 *purA* マーカーを、他部位に比して濃縮することがわかった。複製終点部位近傍に位置する *metB* マーカー

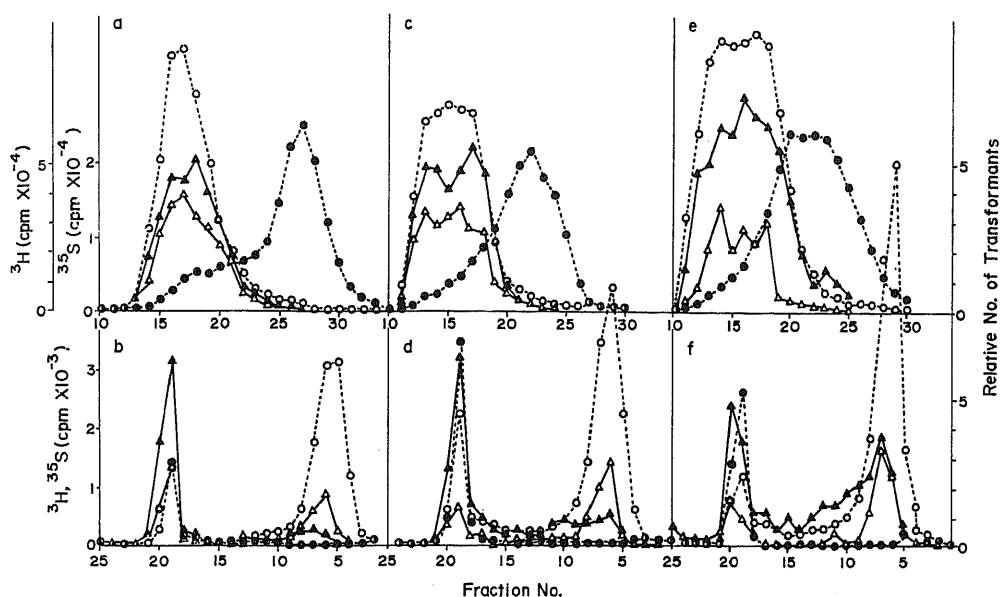


Figure 4. *purA* DNA と細胞膜の結合におよぼす pH の影響

Fig.1 で得られた、粗複合体を集め種々の pH に調製した緩衝液に対して、0°C、12 時間透析後、同じ緩衝液中で、電気泳動を行なった (a.c.e)、泳動後、Fig.2 (c) と同様の方法で遠心を行なった (b.d.f)。

(a,b). P<sub>50</sub>E<sub>10</sub>, pH6.7. (c,d). T<sub>50</sub>E<sub>10</sub> (50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM EDTA), (e,f). T<sub>50</sub>E<sub>10</sub>, pH8.1. ○····○, <sup>3</sup>H radioactivity ; ●····●, <sup>35</sup>S radioactivity ;

(a). *purA* (1 = 1 × 10<sup>5</sup> transformants/ml) ; *hisA* (1 = 5 × 10<sup>3</sup> transformants/ml) ; (b).

*purA* (1 = 5 × 10<sup>3</sup> transformants/ml) ; *hisA* (1 = 2 × 10<sup>2</sup> transformants/ml) ; (c).

*purA* (1 = 1 × 10<sup>5</sup> transformants/ml) ; *hisA* (1 = 5 × 10<sup>3</sup> transformants/ml) ; (d).

*purA* (1 = 2 × 10<sup>3</sup> transformants/ml), *hisA* (1 = 5 × 10<sup>1</sup> transformants/ml) ; (e).

*purA* (1 = 1 × 10<sup>4</sup> transformants/ml) ; *hisA* (1 = 1 × 10<sup>3</sup> transformants/ml) ; (f).

*purA* (1 = 1 × 10<sup>3</sup> transformants/ml), *hisA* (1 = 1 × 10<sup>2</sup> transformants/ml) .

Table 3. Relative amount of DNA and relative transforming activity at various pHs

Fractions	Relative amount of DNA (%)		Relative transforming activity (%)					
	M	Sup	M			Sup		
pH			<i>purA</i>	<i>hisA</i>	<i>metB</i>	<i>purA</i>	<i>hisA</i>	<i>metB</i>
6.7	15.5	75.5	77.0	48.6	75.9	7.5	34.9	15.4
7.5	19.2	67.4	58.9	25.2	—	18.6	56.3	—
8.1	11.4	67.1	34.9	22.8	—	37.0	52.3	—
6.7 - 8.1	21.5	67.1	63.1	42.1	—	21.1	49.2	—

DNA と細胞膜との結合におよぼす、pH の影響を示した。数値は、泳動後、超速心して、重い画分に来る値を相対値で示した。



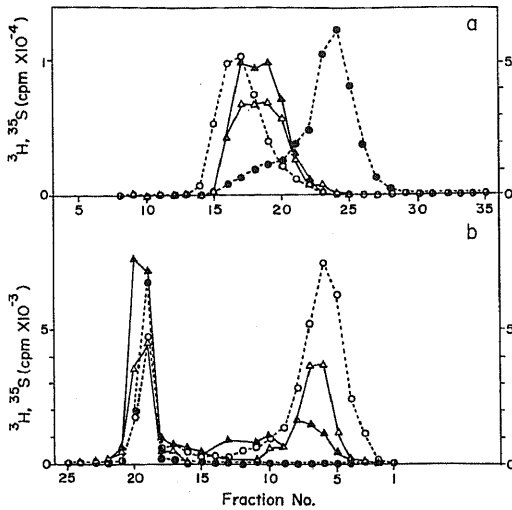


Figure 5. 中性で一度形成した複合体をアルカリ性で泳動、遠心した時のパターン。

Fig.1で得た粗複合体を、 $P_{50E10}$  (pH6.7) 緩衝液に対して、 $0^{\circ}C$  12時間透析後、引き続き、 $T_{50E10}$  (pH8.1) に透析し直した。(a), pH8.1における電気泳動のパターン。(b) Fig.2 (c) に述べた方法と同様に、泳動後、pH8.1で、蔗糖密度勾配超遠心を行なった。

○-----○,  $^3H$ -radioactivity ; ●-----●,  $^{35}S$ -radioactivity ; (a). *purA* ( $1 = 5 \times 10^4$  transformants/ml), *hisA* ( $1 = 2 \times 10^3$  transformants/ml), (b). *purA* ( $1 = 5 \times 10^3$  transformants/ml), *hisA* ( $1 = 2 \times 10^2$  transformants/ml).

も同様に濃縮されることが報告<sup>1)-3)78)</sup>されているが、著者の方法で得た複合体は、*metB* マーカーを僅かしか濃縮しなかった。ところが、Table 3. に示した様に、電気泳動後、遠心しても、*hisA* マーカーと異なり、*metB* マーカーの遊離は認められなかった。従って、複製終点部位は、染色体に結合はしているが、精製の過程で、*metB* マーカーは、ある程度失なわれている可能性が高い。この事は、*metB* マーカーは、*purA* マーカーに比して、せん断力に、より感受性<sup>7)</sup>であることと関連があると思われる。

精製複合体特有のたんぱく成分は、超音波処理によりはじめて検出出来た。ところが、未処理の複合体では、殆んど、DNA に結合していない膜画分と、その組成は類似していた。従って、超音波処理によりはじめて検出出来た、分子量 29,000, 27,000 および 24,000 のたんぱくは、非常に少量なたんぱく成分と思われる。

複合体特有のたんぱくが、非常に少量の膜成分であり、また、DNA に強固に結合していることから、複合

体形成の中心 (core) たんぱくであると思われる。

これらのたんぱくの持つ役割りは、現在の所不明であるが、一つの可能性として、これらのたんぱくは、DNA 上の特定部位を認識し、結合し、さらに、この DNA-たんぱく複合体を膜と結合させる役割が考えられる。

最近、大腸菌において、“DNA-細胞膜複合体”に細胞壁が関与しているという報告がある<sup>19)-21)</sup>。著者の精製した複合体は、1%前後の細胞壁成分を有しており、大腸菌で言われている様な、細胞壁成分の複合体形成への関与があるかもしれないが、現在の所不明である。

DNA-細胞膜複合体に関する研究は、細胞膜という、非常に複雑な機能を有する細胞構造体を取り扱うため、その複合体形成の分子レベルでの解析、および複合体の持つ生物学的意義について不明な点が多い。この様な現時点において、著者の確立した、複合体の単離精製法は、非常に簡便で、この分野の研究に有用と思われる。

現在、著者は、この複合体の生物学的機能、特に複製周期との相関性を、また *in vitro* での再構成系を用いて、複合体形成の分子機構の解析を行なっている。

## 結 論

枯草菌から、簡便な“DNA-細胞膜複合体”の単離・精製法の確立を試みた。

精製した複合体が得られたか、否かは次の二つの観点から確認した。

i) 複合体を出来るだけ温和な条件下で単離し、さらに、複合体は、DNA と特異的に結合している膜成分のみを含むこと。

ii) 精製した複合体は、染色体上の特定部位を含むこと。

以上の観点から、複合体を単離・精製した。

i) DNA に結合した細胞膜と、結合していない細胞膜では、その表層荷電が異なることを利用し、中性でゾーン電気泳動を行ない両者を分離した。

ii) 複合体中の細胞膜に結合した DNA と、細胞膜に結合していない DNA は、蔗糖密度勾配超遠心法により分離した。

i), ii) の方法を併用することにより精製した複合体を得ることが出来た。

精製した複合体は、細胞内DNAの2~5%、細胞内たんぱくの1~4%、P-リピド0.4%および細胞壁成分を1%含んでいた。また、複合体中のDNAは、染色体上の特定部位を濃縮していた。即ち、複製開始点近

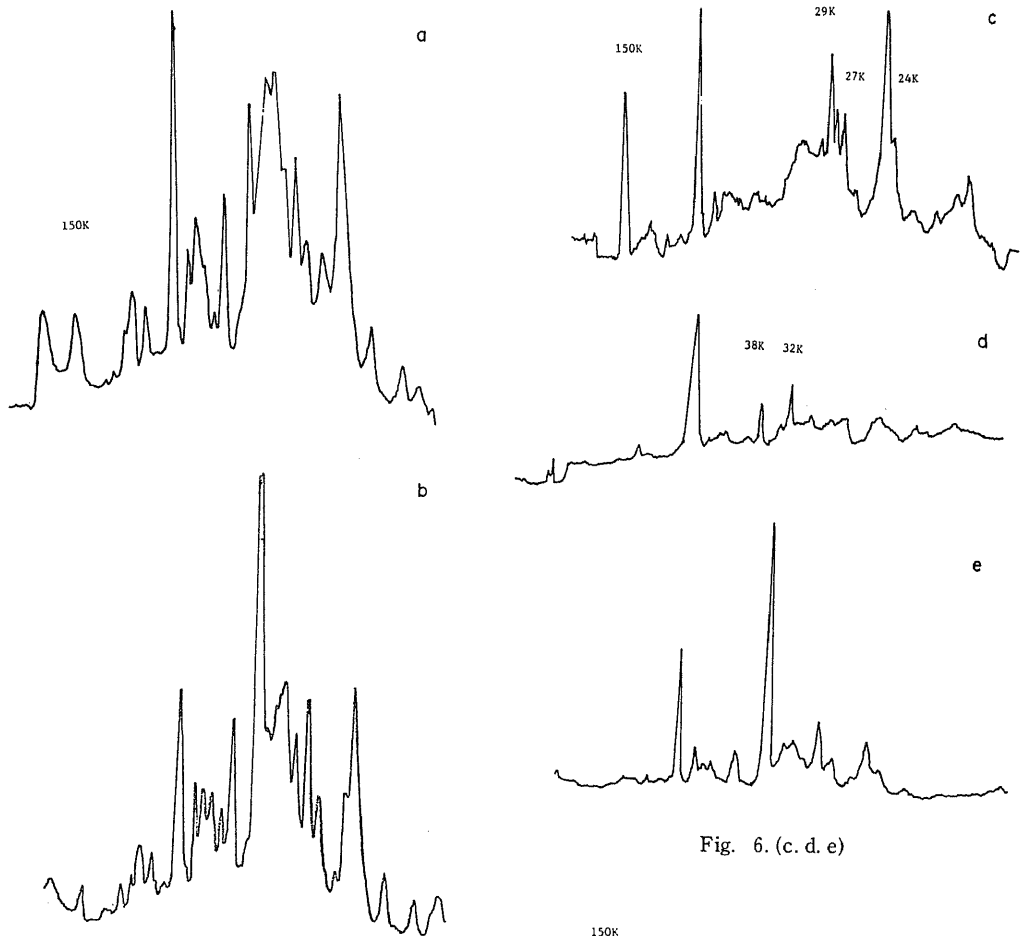


Fig. 6. (a. b)

Fig. 6. (c. d. e)

Figure 6. 精製複合体の SDS- ポリアクリルアミドゲルパターン.

V-5 で述べた方法に従って、複合体中のたんぱく成分を解析した.

- (a) 未処理の複合体
- (b) 未処理の DNA に結合していない膜
- (c) 30 秒超音波処理した複合体
- (d) (c) と同様
- (e) 30 秒処理した時の DNA に結合していない膜
- (f) 60 秒処理した時の複合体
- (g) 60 秒処理した時の DNA に結合していない膜

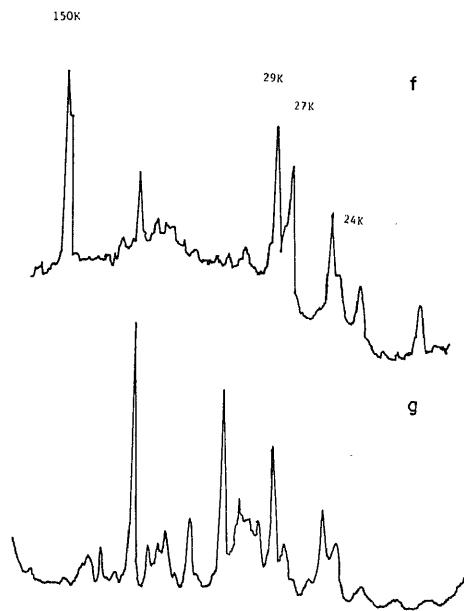


Fig. 6. (f. g)

傍にある, *purA* マーカーは, 他のマーカーに比して濃縮されたが, 複製終点近傍にある *metB* マーカーは, 僅かしか濃縮されなかった. *purA*-DNA と細胞膜との結合は, 電気泳動を行なう際の緩衝液の pH に影響される. この結合は, 中性で安定だが, アルカリ性では不安定である. 約 50% 以上の *purA* マーカーが, アルカリ性の条件下 (pH 8.1) で, 精製した複合体から遊離した.

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて, 複合体と, DNA に結合していない細胞膜のたんぱく成分を解析した. その結果,

i). 超音波処理をして, 複合体中のたんぱく含量が, 全たんぱく量の 0.1% 以下になって始めて差異が認められた.

ii). 複合体特有のたんぱく成分は, 分子量 29,000, 27,000 及び 24,000 であった.

稿を終るにあたり, 本研究に対して, 終始御指導をいただいた, 吉川寛教授をはじめ, 御助言をいただいた, 山口和男博士, 村上清史助教授, 小笠原直毅博士に心から感謝致します. また図表の作成をしていただいた, 寺田和代さん, 培地の調製をしていただいた, 安土勝美さん, 電顕写真をとっていただいた, 伊藤正人氏に謝意を表します.

## 文 献

- 1) Sueoka, N. & Quinn, W. G. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **33**, 695 (1968).
- 2) Snyder, R. W. & Young, F. E. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **35**, 354 (1969).
- 3) Yamaguchi, K., Murakami, S. & Yoshikawa, H. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**, 1559 (1971).
- 4) Ivarie, R. D. & Pene, J. : J. Bacteriol., **104**, 839 (1970).
- 5) Sueoka, N. & Hammers, J. M. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **71**, 4787 (1974).
- 6) Ganesan, A. T. & Lederberg, J. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **18**, 824 (1965).
- 7) Yamaguchi, K. & Yoshikawa, H. : Nature New Biol., **244**, 204 (1973).
- 8) Yamaguchi, K. & Yoshikawa, H. : J. Bacteriol., **124**, 1030 (1975).
- 9) Fielding, P. & Fox, F. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **41**, 157 (1970).
- 10) Parker, D. J. & Glaser, D. A. : J. Mol. Biol., **87**, 153 (1974).
- 11) Fuchs, E. & Hanawalt, P. C. : J. Mol. Biol., **52**, 301 (1970).
- 12) Smith, D. W. & Hanawalt, P. C. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **149**, 519 (1967).
- 13) Ryter, A. : Bacteriol. Rev., **32**, 39 (1968).
- 14) Inouye, M. & Pardee, A. B. : J. Biol. Chem., **245**, 5813 (1970).
- 15) Siccardi, A. G., Shapiro, B. M., Hirota, Y. & Jacob, F. : J. Mol. Biol., **56**, 475 (1971).
- 16) Harmon, J. M. & Taber, J. W. : J. Bacteriol., **130**, 1224 (1977).
- 17) Gudas, J. L., James, R. & Pardee, A. B. : J. Biol. Chem., **251**, 3470 (1976).
- 18) Gudas, J. L. & Pardee, A. B. : J. Mol. Biol., **101**, 459 (1976).
- 19) Heidrich, H. G. & Olsen, W. L. : J. Cell. Biol., **67**, 444 (1975).
- 20) Olsen, W. L., Heidrich, H. G., Hanning, K. & Hofschneider, P. H. : J. Bacteriol., **118**, 646 (1974).
- 21) Portalier, R. & Worcel, A. : Cell, **8**, 245 (1976).
- 22) Earhart, C. F., Tremblay, G. T., Daniels, M. J. & Schaechter, M. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **33**, 707 (1968).
- 23) Yoshikawa, H. : Genetics, **54**, 1201 (1966).
- 24) Kadoya, M., Mitsui, H. & Takagi, Y. : Biochim. Biophys. Acta., **91**, 36 (1964).
- 25) Haas, M. & Yoshikawa, H. : J. Virol., **3**, 248 (1969).
- 26) Bligh, E. G. & Dyer, W. J. : Canad. J. Biochem. Physiol., **37**, 911 (1959).
- 27) Laemmli, L. K. & Favre, M. : J. Mol. Biol., **80**, 575 (1973).
- 28) Bonner, W. M. & Lasky, R. A. : Eur. J. Biochem., **46**, 83 (1974).
- 29) Davis, R. W., Simon, M. & Davidson, N. : Methods in Enzymology, ed. Grossman, L. & Modare, K., vol. XXI D, p. 413, New York, Academic Press, 1971.
- 30) Yamaguchi, K. & Yoshikawa, H. : J. Mol. Biol., **110**, 214 (1977).

## A b s t r a c t

We have developed a simple procedure to purify a DNA-membrane complex from *Bacillus subtilis*. A crude DNA-membrane complex was obtained from a sheared lysate through centrifugation in a sucrose gradient and then purified by electrophoresis in a sucrose density gradient. Based on the difference in electromobility, a DNA-membrane complex was separated effectively from a bulk of membrane fragments which did not bind DNA. An artificial entrapment of membrane fragments into DNA was excluded.

The purified DNA-membrane complex contained 2 to 5% of total cellular DNA, 1 to 4% of total cellular protein, 0.4% of total cellular lipid and 1% of wall component as glucosamine. DNA in the complex was enriched for *purA*, a genetic marker near the replication origin, and in lesser extent *metB*, a marker near the replication terminus, compared with markers on the other regions of the chromosome. The association of the *purA*-DNA to the membrane was affected by pH of the buffer during electrophoresis. Thus, the association was stable in neutral and slightly acidic condition but unstable in alkaline pHs. About a half of *purA* marker was released from the purified complex at pH8.1.

Analysis by SDS acrylamide gel electrophoresis showed that some unique proteins, 29,000, 27,000 and 24,000 daltons, were detected in the complex only when most proteins were removed from the complex by sonication.

---