

# 枯草菌におけるNutritional Shift-up後の高分子合成について

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/2297/8617">http://hdl.handle.net/2297/8617</a>

## 枯草菌における Nutritional Shift-up 後の 高分子合成について

金沢大学がん研究所生物物理部 (主任: 吉川 寛教授)

村 上 俊 吾

(昭和51年1月17日受付)

細菌細胞の定常状態 (steady state) における生育速度は培地に特徴的であるが、この調節機構についての研究は1950年代以来多くの研究者によってなされてきた。今日に至るこの間の研究はまず第1に、定常状態にある細菌細胞においては培地の種類に無関係に細胞当りのリボゾーム量がその生育速度に比例して増加すること<sup>1)~3)</sup>、第2に、大腸菌 (E.coli) やサルモネラ菌 (S. typhimurium) で示されてきたように、poor な培地で定常状態にある細菌細胞が、より rich な培地に shift されるときには、リボゾームRNA (r-RNA) やトランスフェーRNA (t-RNA) という stable RNA が、shift 後ただちに、shift 後の rich な培地に特徴的な速度で蓄積され始めること<sup>4)~6)</sup>を明らかにしてきた。これらの事実は、Maaløe<sup>6)</sup>が指摘するように、stable RNA 合成の制御機構こそが細菌細胞の定常状態における生育速度を決定する上での中心的要因であることを示唆するものである。一方、細菌細胞が、ある培地条件下で定常状態の生育をするためには、細胞分裂速度 (generation time) と細胞質量の増加速度 (doubling time) とが厳密に一致していなければならないと思われる<sup>7)~10)</sup>。今日、細胞分裂の頻度を制御する機構はまだよく知られていないが、DNA の複製開始頻度が細菌細胞の DNA 合成の調節に重要な役割を果しているだけでなく、更に細胞分裂速度の調節にも密に関与していると考えられるようになっている<sup>11)~14)</sup>。このような理由から、近年、stable RNA 合成と DNA 複製開始との相互の関連性が興味をもって研究され始めてきた。Bleicken<sup>13)</sup> はリボゾーム量と DNA 複製開始頻度とがともに生育速度の関数として同様の態度で変化することを指摘し、Maaløe<sup>15)</sup> は DNA 複製開始頻度が細胞内のリボゾーム量によって決定されるというモデルを提出してきた。

筆者は遺伝解析<sup>16)</sup> および DNA 複製の研究<sup>17)</sup> が比較的よくなされてきた枯草菌を用いて、nutritional shift-up 後にみられるリボゾーム合成と DNA 複製開始頻度との相互依存性について解析を試みた。この研究においては、各種の高分子合成阻害剤を使用した。これに加えて、rich な培地条件にもかかわらず遅い生育速度しか獲得しえない変異株の使用は各高分子合成制御の相互関連性を理解する上で極めて有用な手段であることがわかった。結果は nutritional shift-up 後の stable RNA 合成が2つの stage、即ち蛋白質合成に依存し DNA 合成に依存しない stage I と DNA 合成に依存する stage II とからなること、および shift-up 後の DNA 複製開始頻度の増加が単純にリボゾームの増加だけでは説明できず、むしろ複製開始頻度を決定する上で重要な位置を占める initiator 蛋白質の合成が transcription のレベルで直接的に培地の変化によって制御されていることを明らかにした。

### 実験材料および方法

#### I. strains

1. *Bacillus subtilis* 168wild (CRK4000)
2. *Bacillus subtilis* 168LMAH (CRK3000)  
genotype: leu8, metB5, purA16, hisA3
3. *Bacillus subtilis* 168wild mutant strain (CRK4001)  
これは B. sub. 168Wild (CRK4000) をニトロソグアニジンで処理し、BHIプレート上で37°C、24時間培養後、小さなコロニーを探すことにより分離された。
4. *Bacillus subtilis* 168TA (NIG17)<sup>18)</sup>  
これは国立遺伝学研究所賀田恒夫博士より供与された。

Macromolecular synthesis after a nutritional shift-up of *Bacillus subtilis*. Shungo Murakami, Department of Biophysics (Director: Prof. H. Yoshikawa), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

gemotype : trp, arg

#### 5. *Bacillus subtilis* 168TA (NIG45)<sup>18)</sup>

これは遺伝研賀田恒夫博士より供与された。NIG17を親株として得られた recombination deficient mutant であり、既知の遺伝子 recA1 に強く link している。

gemotype : trp, arg

#### II. media

##### 1. Lp培地 :

Bacto Beef Extract 1.5g, Bacto Yeast Extract 1.5g, Bacto Peptone 5g, NaCl 3.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 140mg, NH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> 60mgを最終濃度が0.1M Tris-HCl pH7.1, 総量が1lになるように溶かし調合した。この培地は使った3つの培地の中でもっとも rich である。

##### 2. C培地<sup>19)</sup> :

今回の実験においては phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 濃度を10<sup>-3</sup>Mに下げて使った。この培地は使った3つの培地の中でもっとも poor である。

##### 3. C<sup>A</sup>培地 :

C培地に20種類のアミノ酸をそれぞれ20μg/ml加えたものである。この培地は中等度の生育速度を与えた。

#### III. growth

細菌は37°Cで振とう培養された。グルコースは炭素源としてあらゆる培地に最終濃度0.5%、要求アミノ酸は50μg/ml加えられた。濁度は Klett colorimeter (red filter) で測定された。nutritional shift up は培地Cで対数増殖期にある細菌培養に20種類のアミノ酸を加えることによって行なわれた。蛋白質量は volume×Klett unit が約100になるように細菌培養を採取し、Lowry<sup>20)</sup>らの方法により測定された。DNA量は <sup>32</sup>P-Orthophosphate (3Ci/mole Pi) を含む培地中で細菌を増殖させ、適時に2mlを採取し、n-ブタノールで phospholipid を抽出したのち、KOHを1Nになるように加え、37°Cで一晩処理した。これを1N-HClで中和した後、10% cold TCA (トリクロン酢酸) を加え、TCA 不溶性の分画を Glass fiber filter (Whatman製, GF/C) 上に集めトルエン・PPOシンチレーターを用いてその放射能活性を測定することから求められた。RNA量は <sup>32</sup>P-Orthophosphate (0.3Ci/mole Pi) を含む培地中で細菌を増殖させ、適時に0.5mlを採取し、10% TCA 不溶性の分画の放射能活性をDNA量の場合と同様に測定し求められた。

#### IV. DNA の抽出

volume×Klett unit が約100になるように細菌培

養を採取し、これに1M NaNO<sub>3</sub>を最終濃度25mMに加え急速に氷冷した。低速遠心で菌体を集めた後、Saito & Miura の pH9.0 フェノール法<sup>21)</sup>によりDNAを抽出し、0.5mlの1×SSC (0.15M NaCl, 0.015M Na<sub>3</sub>-citrate) に溶解させ、形質転換の実験に用いた。

#### V. リボゾームの調製

##### 1. shift-upの実験からの場合 :

<sup>32</sup>P-Orthophosphate (3Ci/mole Pi) を含む培地で細菌を増殖させ、適時に細胞数が約8×10<sup>8</sup>になるように培養液を採取し、これに1M NaNO<sub>3</sub>を最終濃度25mMに加え急速に氷冷した。遠心で菌体を集め、2度 TM 緩衝液 (5mM Tris-HCl, 10mM Mg-acetate pH7.2) で洗浄した後、2mlの TM 緩衝液に懸濁した。超音波処理後、細菌抽出液を TM 緩衝液で4mlに希釈し、25,000g, 30分の遠心で cell debris を落した後、上清を TM 緩衝液で8mlに希釈し、104,000g, 2.5時間遠心した。得られた pellet はリボゾーム分画として使われた。

##### 2. 定常状態からの場合 :

<sup>3</sup>H-Uracil (1μCi/20μg/ml) を含む培地中で細菌を増殖させ、Klett unit が約15のときに培養液5mlを採取し菌体を集めた。一方168Wの培養液100mlを Klett unit が約40のときに採取し、同様に菌体を集め、これを Carrier cell とした。Carrier cell と labeled cell とを一諸に TM 緩衝液に懸濁し、2度洗浄した後、2mlの TM 緩衝液に懸濁し、超音波処理後上記のごとく ribosomal pellet を調製した。このようにして得られた pellet はショ糖密度勾配遠心でのパターンから mature なリボゾーム分画を含んでいることが確認された。

#### VI. 形質転換

形質転換は Haas & Yoshikawa の方法<sup>22)</sup> に従って行なわれた。Recipient cell として CRK3000 が使われ、また形質転換は対照として同時に 168W の孢子から抽出した DNA を用いてなされた。

#### VII. 遺伝子頻度測定法<sup>23)</sup>

枯草菌では DNA 複製の起点および終点の各々に近い位置にある遺伝子が同定されており<sup>16)</sup>、細胞内のそれら遺伝子の頻度は抽出した DNA による形質転換活性を測定して求めることができる。これら遺伝子頻度の相対比 (起点/終点 = purA/metB) の値は DNA 抽出時の細胞の DNA 複製様式を直接反映している。この値はサンプル DNA を用いて得られた purA/metB 比を孢子 DNA を用いて得られた purA/metB 比で割り補正することによって求められた。

## Ⅷ. 試薬

1. 6-para-hydroxyphenylazouracil (6HPur a): Dr. B. W. Langley (Imperial Chemical Industries Limited) から供与された.
2. Nalidixic acid: PL Biochemicals Inc.
3. ビューロマイシン: Nutritional Biochemicals Corp.
4. クロラムフェニコール: Parke, Davis and Co.
5.  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphate: 第一化学薬品株式会社
6.  $^3\text{H}$ -Uracil: New England Nuclear

## 実験結果

## I. 生育パラメーターの比較

まず始めに、枯草菌の4株について、異なった3種類の培地で増殖させたときの生育パラメーターを決定

し、その比較を試みた。表1に示すように、168Wにおいては、培地が rich になるにつれて doubling time は短かく、遺伝子頻度は大きくなる。これに対し、変異株 CRK4001 においては、もっとも rich なLp培地においてさえ、doubling time は55分であり、また purA/metB 比は2.0を超えることはない。NIG17の場合、doubling time および遺伝子頻度の培地依存性は168Wの場合とほぼ同じ傾向を示している。rec 変異株の NIG45<sup>18)</sup>においては、doubling time はいずれの培地においてもほぼ同じ値を示しているが、遺伝子頻度は培地が rich になるにつれて顕著ではないが大きくなっている。次にこれら実測値としての doubling time および遺伝子頻度から染色体当りの平均複製点数 (n) と1サイクルの染色体複製を完了するのに要する時間 (C) とを計算してみた<sup>17)23)</sup>。168W の場合、Cは培地Cでは56.5分で、培地C<sup>A</sup> および Lp のときの約40分より長くなっ

Table 1 Growth parameters during the steady state growth<sup>a</sup>

Strain	Medium	$\tau$	purA/metB	$n(=C/\tau)^b$	$C^c$
168W	C	70	1.75	0.807	56.5
	C <sup>A</sup>	30	2.50	1.327	39.8
	Lp	20	4.04	2.010	40.0
CRK4001	C	100	1.55	0.632	63.2
	C <sup>A</sup>	65	1.73	0.782	50.9
	Lp	55	1.91	0.933	51.3
NIG17	C	70	1.88	0.910	63.8
	C <sup>A</sup>	43	2.34	1.226	52.7
	Lp	35	2.83	1.500	52.5
NIG45	C	70	1.75	0.807	56.5
	C <sup>A</sup>	65	2.00	1.000	65.0
	Lp	60	2.45	1.290	77.6

a)細菌は3種類の培地を使い37°Cで振とう培養された。生育は Klett colorimeter で培養液の濁度を測定することにより調べられた。生育速度は対数増殖期の速度から決定され、doubling time (分) で表示された。DNA の抽出および purA/metB 比の決定は実験方法で述べたようにして行なわれた。

b)染色体当りの平均複製点数 (n) は

$$n = \frac{\log_{10} \text{purA/metB}}{\log_{10} 2}$$

から算出された (Sueoka & Yoshikawa, 1965)。

c)1 サイクルの染色体複製を完了するのに要する時間 (C) は  $C = n\tau$  から算出された (Ephrati-Elizur & Borenstein, 1971)。

ている。本質的に同様の傾向は CRK4001 および NIG17 でも見られる。ただし、これらの場合、Cはいずれの培地においても168Wよりは約10分長くなっている。このような傾向に対し、NIG45においては、Cは培地が rich になるにつれて長くなっている。

## II. Nutritional shift-up 後の高分子合成

168W と CRK4001 を使い、nutritional shift-up 後の高分子合成速度の変化を調べた。図1および表2に示すように、168Wにおいては、stable RNA は shift 後10分から15分以内に shift 後の培地に固有な速度で蓄積し始めた。一方、DNA および蛋白質合成速度は shift 後約30分程して shift 後の培地に固有な速度に到達した。これは現象的にはすでに

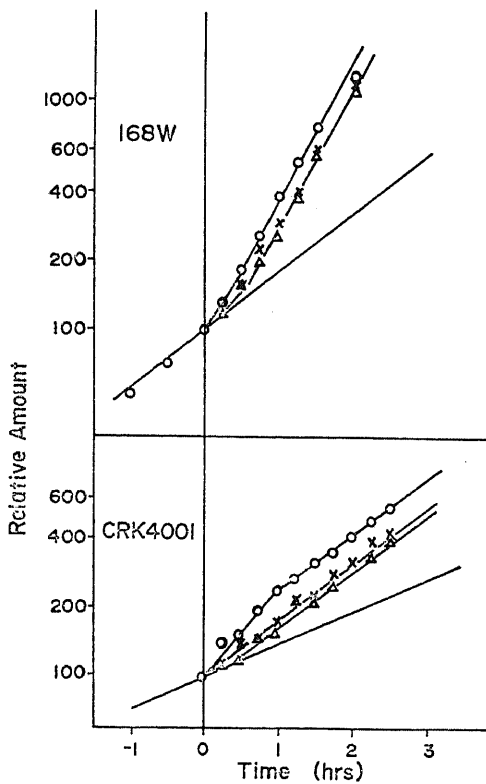


Fig. 1 nutritional shift-up の高分子合成に対する効果

親株168W (上図) および変異株 CRK4001 (下図) の培地Cでの対数増殖期の培養液を Klett unit が約5になるように同じ培地で2倍希釈した。直ちにアミノ酸混合液を加え、shift-upを行なった。shift 前後の各時間に、実験方法で述べたようにして RNA 量 (○—○)、DNA 量 (△—△) および蛋白質量 (×—×) を測定した。各高分子量は shift-up 時 (0 time) の量を100とする相対量で表示された。

大腸菌やサルモネル菌でなされた shift-up 実験の結果とよく一致している<sup>10)20)</sup>。これに対し、変異株 CRK4001 においては、shift 後の stable RNA 合成速度の急激な増加はやはり同様に観察されたが、168W の場合とは違って、得られた最大速度は doubling time で46分であり、168W の場合の30分よりも幾分遅かった。しかも、shift 後直ちに得られた新たな stable RNA 合成速度は、168W の場合はその後の培養においてもずっと維持されるのに対し、CRK4001 においては shift 後60分間だけ維持され、その後は shift 後の培地に固有の速度に減少していった。ところで、shift 後の mature ribosome の合成速度の変化は、168W および CRK4001 ともに stable RNA 合成速度の変化と全く同じ様式を示した (図2)。このことは、stable RNA 合成についての結果がリボソーム合成を反映しているものとみなしうることを意味している。nutritional shift-up の stable RNA 合成に対する CRK4001 で観察されたと同様の効果はNIG45においてもまた観察さ

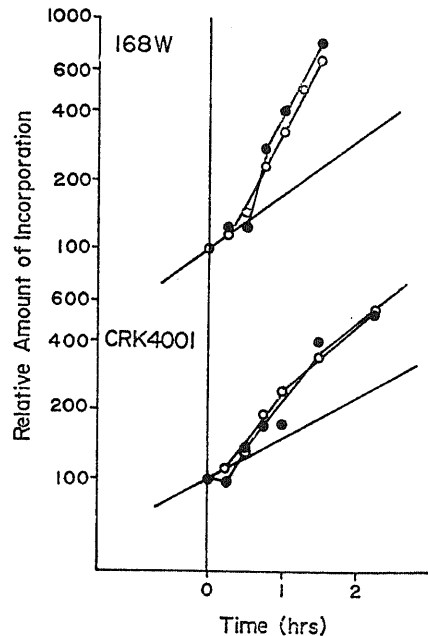


Fig. 2 shift-up のリボソーム合成に対する効果

実験方法および図1で述べたように、168W (上図) および CRK4001 (下図) を <sup>32</sup>P-Orthophosphate を含む培地で増殖させ、shift-upを行なった。各時間に <sup>32</sup>P の stable RNA (○—○) およびリボソーム (●—●) への取り込みを測定した。取り込みの相対量は図1と同じように表示された。

Table 2 Effect of the nutritional shift on macromolecular synthesis<sup>a</sup>

Strain	Measurement	Doubling time ( $\tau$ ) (min) <sup>b</sup>			lag period <sup>c</sup> (min)
		Pre-shift	Post-shift		
			0-60 min	later than 60 min	
168W	turbidity	70	30	30	—
	RNA	70	30	30	6
	DNA	70	30	30	26
	Protein	70	30	30	26
CRK4001	turbidity	100	70	70	—
	RNA	100	46	70	0
	DNA	100	70	70	27
	Protein	100	70	70	0

a) 結果は図1に示す実験から得られた。

b) 濁度および各高分子合成の doubling time は図1の結果から算出された。

c) lag period は shift-up の時点から各高分子合成の速度が増加し始める時点までの時間を意味する。これも図1の結果から算出された。

れた。このようなCRK4001とNIG45とで見られる168Wとは異なった shift 後の stable RNA 合成についての詳しい結果を図3に示す。ところで、このような stable RNA 合成に対し、DNA および蛋白質の合成速度は shift 後約30分程して直接 shift 後の培地に固有な速度に到達した。以上の結果から明らかなのは、CRK4001においては nutritional shift-up の stable RNA 合成に対する効果と DNA 合成に対する効果とが異なるということである。即ち、このことは、shift-up に伴う DNA 合成速度の増加は stable RNA 合成速度の増加の直接的結果ではなく、むしろ別の異なる制御機構により調節されていることを示唆するものである。

### III. Shift-up 後の stable RNA 合成に対する DNA 合成阻害の効果

これまでの結果は次のことを明らかにした。即ち、CRK4001の場合、shift 後60分までの stable RNA 合成速度は doubling time で46分であり、本来の shift 後の培地に固有な速度よりも早いにもかかわらず、この間の DNA 合成速度は本来の shift 後の培地に固有な速度、すなわち doubling time で70分でしかありえなかった。しかし60分目以降は、shift 後の stable RNA 合成速度と DNA 合成速度とはともに70分でよく一致した。このことは、shift 後60分までの DNA 合成速度に依存しない stable RNA 合成速度が60分目以降は DNA 合成速

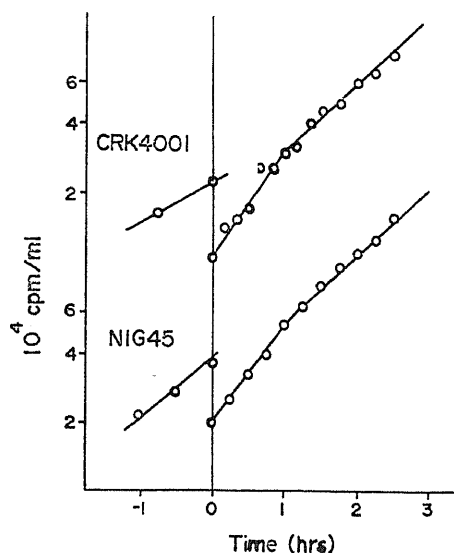


Fig. 3 変異株 CRK 4001 および NIG45 における shift-up 後の stable RNA 合成

図1と同じ方法で行なった。培養液の採取は10分おきに0.5 ml を duplicate して行なわれた。各点はこれらの平均値を示す。

度に依存するため、この遅い速度に引き戻されたと解釈できる。そこで次に、shift 後の stable RNA 合成に対する DNA 合成阻害の効果調べた。DNA 合成阻害剤としては、枯草菌の DNA ポリメラーゼ

Ⅲに直接に作用して DNA 合成を特異的に阻害することが知られている 6 HPura を使った<sup>25)</sup>。結果は図4に示す。まず培地CおよびC<sup>A</sup>での対数増殖期の培養液に 6 HPura を添加した場合、stable RNA の蓄積速度は直ちに exponential から linear に変化した。これに対し、薬剤を shift-up と同時に添加したときには、stable RNA の exponential な蓄積が観察された。しかしこの場合、exponential な蓄積速度は薬剤を添加しなかった対照に比べて遅く、しかも shift 後60分間だけ維持されるのみで、それ以降は linear な蓄積速度に変わっていった。薬剤を shift 後20分あるいは40分に添加したときは、添加の時点で shift に伴う早められた stable RNA 合成速度は幾分抑えられたが、依然として shift 後60分間は exponential な蓄積を示し、それ以降は linear に変わっていった。更に注目すべきことは、shift 後60分以降に薬剤を添加した場合は、stable RNA の蓄積速度は始めから linear に変化することである。strain 差および薬剤処理に伴う差の比較を容易にするため、図4の結果を shift-up 前後の stable RNA 合成速度の相対値を使って図5にまと

めた。図4における stable RNA の linear な合成は図5においては減衰直線として示される。図4および図5の結果は、shift 後の stable RNA 合成速度の変化は最初の60分間は DNA 合成に依存しないが (stage I)、一度増加した速度の維持には DNA 合成速度の増加を必要とするという初めの仮定を支持するものである。

#### IV. Shift-up 後の stable RNA 合成に対する蛋白質合成阻害の効果

図6に示すように、ピューロマイシンの添加は nutritional shift-up 後の stable RNA 合成速度の急激な増加を阻害した。同様の結果は阻害剤としてクロラムフェニコールを使ったときも得られた。これらの結果から、shift-up の stable RNA 合成に対する効果の出現には蛋白質合成が必須であることは明らかである。しかし、この結論は、蛋白質合成阻害は shift-up 後の stable RNA 合成速度の増加に何ら影響することはないとする Maaløe<sup>1)</sup>らの結論と相反するものである。そこで、このピューロマイシンの阻害効果についてもう少し詳しく研究を試みた。この実験においては 168W を使い、ピューロマイシ

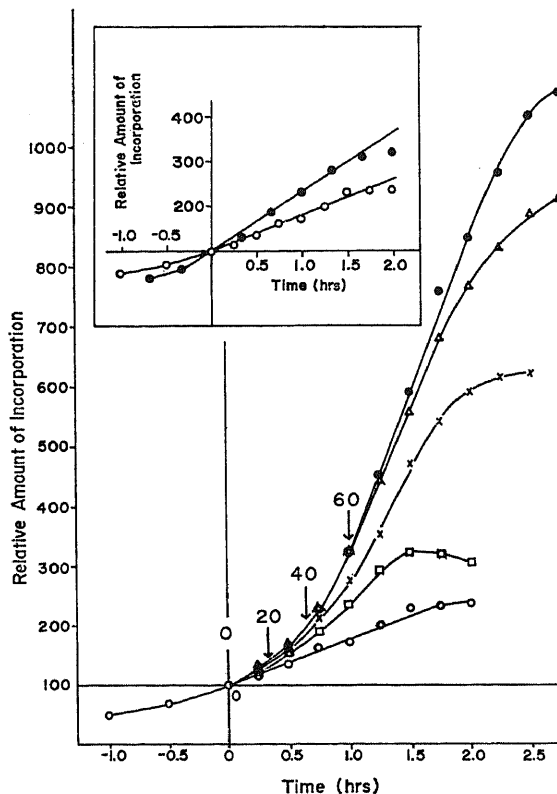


Fig. 4 shift-up後の stable RNA 合成に対する DNA 合成阻害の効果

実験方法および図1で述べたように、168Wを<sup>32</sup>P-Orthophosphateを含む培地で増殖させ、shift-upを行なった。shift-up時に培養液を5等分し、矢印で示す shift 後の0分(□—□)、20分(×—×)、40分(△—△)および60分(●—●)に 6 HPura (70 $\mu$ M)を加えた。残りの一つ(○—○)は shift時にアミノ酸混合液を加えず、6 HPura だけを加えた。挿入図は、168Wを培地C(○—○)およびC<sup>A</sup>(●—●)で Klett10まで増殖させたのち、6 HPura (70 $\mu$ M)だけを加えた実験を示す。<sup>32</sup>Pの stable RNA への取り込みは duplicate で測定された。

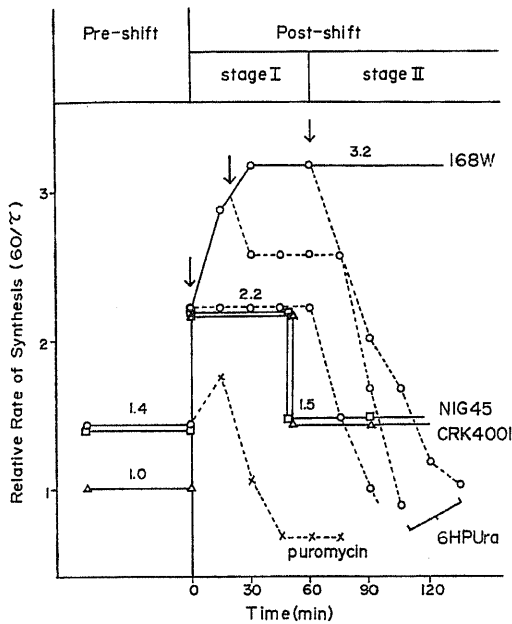


Fig. 5 shift-up 後の stable RNA 合成：図1, 図3 および図4の要約

stable RNA 合成速度は  $60/\text{doubling time}$  で表示され、図1および図3の片対数プロットの tangent から算出された。図4の場合は、片対数グラフにプロットしなおした後、同様に速度を算出した。また図4の直線速度は、この図においては減衰速度で表示された (○……○)。矢印は168Wの培養液に6HP Ura を添加した時間を示す。shift-up 後の stable RNA 合成に対するピュロマイシンの効果を明示するため図6の結果を追加した (×……×)。168W：○—○, ○……○, ×……×; CRK4001: △—△; NIG45: □—□

ンは培地CおよびC<sup>A</sup>での対数増殖期の培養液および shift 後の各時間に添加された。

図7において、薬剤添加後の stable RNA 合成は添加時の RNA 量を100として図示された。この図で明らかのように、stable RNA 合成速度はピュロマイシン添加後ただちに2段階の直線的な速度変化を示すが、この様式はすべての場合で同じである。しかしながら、薬剤添加後の相対合成量は2つの培地で明らかに異なっていることがわかる。また薬剤を shift 後の各時間に添加した場合は、添加後に合成される stable RNA の相対量は shift 後10分以内に培地Cで観察される合成量から培地C<sup>A</sup>で観察される合成量に変化した。

以上の結果は第1に、shift-up 後の stable RNA 合成速度の急激な増加は蛋白質合成に依存するこ

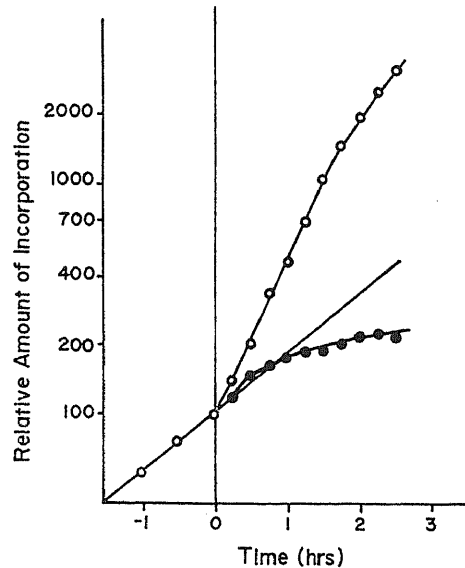


Fig. 6 shift 後の stable RNA 合成に対するピュロマイシンの効果

実験方法および図1で述べたように、168Wを <sup>32</sup>P-Orthophosphate を含む培地で増殖させ、shift-up を行なった。shift-up 時に培養液を2等分し、その一方には直ちにピュロマイシン (100 μg/ml) を添加し、他方は対照としてそのまま培養を続けた。各時間に、<sup>32</sup>Pの stable RNA への取り込みを測定した。対照: ○—○; ピュロマイシン添加: ●—●

と、第2に、この蛋白質合成に依存する shift 後の RNA 合成のパターンは10分以内にCタイプからC<sup>A</sup>タイプに変化することを明らかにした。このように、nutritional shift-up 後の stage I で観察される stable RNA 合成は DNA 合成には依存しないが蛋白質合成に依存した現象であると結論される。

#### V. Shift-up 後の複製開始頻度と DNA 合成速度の変化

168W および CRK4001 の培地Cでの対数増殖期の培養液にアミノ酸を添加すると DNA 合成速度は約30分のlagののち、それぞれの shift 後の培地に固有な速度に到達するが、このような DNA 合成速度の変化にみられる反応は、DNA 複製開始頻度が shift 後直ちに shift 後の培地に固有な生育速度に一致した複製開始頻度に変化するためであると理解されてきた。ところで、このような解釈の妥当性は shift 後の DNA 複製の起点と終点の比、すなわち purA/metB 比の変化を測定することにより調べることができる<sup>13)</sup>。さて、168WとCRK4001を使ってのこの種の実験結果を図8に示す。両方の strain において、



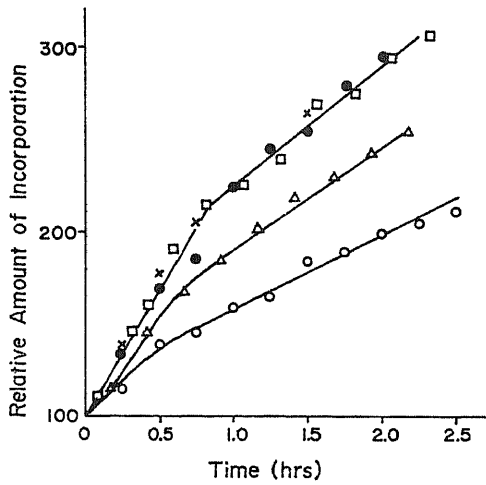


Fig 7 ピューロマイシンの効果についての詳細な分析

168 W を  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphate を含む培地 C および C で増殖させた。Klett unit が 10 のときに、培地 C での培養液を 4 等分し、そのうちの 3 つには図 1 で述べたようにしてアミノ酸混合液を加え shift-up を行なった (0 time)。ピューロマイシンは、0 time に培地 C (○—○) および C<sup>A</sup> (●—●) での対数増殖期の培養液、および shift 後 5 分 (△—△), 10 分

(□—□), および 60 分 (×—×) の培養液に加えられた。各時間に  $^{32}\text{P}$  の stable RNA への取り込みを測定した。

purA/metB 比は shift 後直ちに増大することがわかる。ところで、Bleekken は shift 前および shift 後の培地での C, すなわち 1 サイクルの染色体複製を完了するのに要する時間がともに同じという条件のもとで、DNA 複製開始頻度が shift 後直ちに shift 後の培地に固有の調節機構に従って増加する場合の複製起点と終点の頻度の変化を分析しているが、この分析によると、起点頻度は shift 後直ちに shift 後の培地に固有な速度で増加するが、終点頻度は shift 後 C 時間目に固有の速度で増加し始める。このことは shift 後 C 時間目にはじめて起点/終点比が shift 後の培地に固有な値に達することを意味している。図 8 の場合も、shift 後の C 即ち 1 サイクルの染色体複製を完了するのに要する時間が約 60 分であるとすれば、Bleekken の計算と実によく一致することがわかる。表 1 に示すように、培地 C での C は 168 W の場合は 57 分、CRK4001 の場合は 63.2 分であるが、このことは、進行中の複製点での DNA 合成が shift 後においても shift 前の培地に固有な速度で継続されることを示唆するものである。ところで、168 W

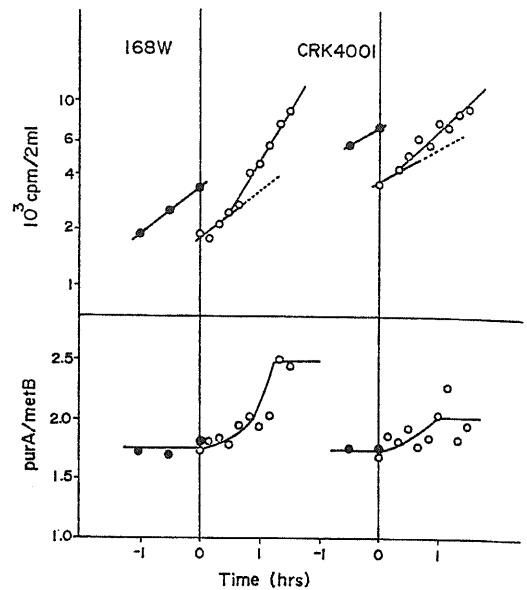


Fig 8 shift-up 後の DNA 合成速度と遺伝子頻度 (purA/metB) の変化

実験方法および図 1 で述べたように、168 W (左図) および CRK4001 (右図) を  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphate を含む培地 C で増殖させ、shift-up を行なった。実験方法で述べたようにして、各時間に  $^{32}\text{P}$  の DNA への取り込み (上図) を測定し、また purA/metB 比 (下図) を決定した。

においては、purA/metB 比は shift 後 60 分以内に 1.43 倍に増大したが、この値は shift 前および shift 後の培地における purA/metB から得られる DNA 複製開始頻度をそれぞれ  $n_1$ ,  $n_2$  とすれば、 $n_2/n_1$  比の 1.65 倍の増加により達成されたものである。

一方、表 1 の結果から明らかのように、対数増殖期の細胞で得られた purA/metB 比から  $n_1/n_2$  比は 1.65 と計算される。このような事実は、DNA 合成速度が DNA 複製開始頻度の変化によってのみ制御されていること、しかもこの複製開始頻度は shift 後ただちに、shift 後の培地で対数増殖期にある細胞が制御を受けていると全く同一の機構で調節されることを示すものである。

168 W に対し、CRK4001 においては、shift 後の  $n_2/n_1$  比は最大 1.24 倍に増大するだけであるが、この値もまた表 1 の対数増殖期の細胞で得られた結果から計算された値とよく一致する。しかし、この結果は shift-up の stable RNA 合成に対する効果とは著しい相違を示している。即ち、すでに述べたように、CRK4001 においては、shift 後の stable RNA

合成は一時的であれ、shift 後60分間は shift 後の培地に固有な速度よりは増加した速度で進行した。しかしながら、DNA 合成速度、すなわち DNA 複製頻度はそのような一時的増加を示すことはなかった。これらの事実は、shift-up の DNA 複製開始頻度の増加に対する効果を減少せしめることが CRK4001 の変異がもつ一義的效果であることを示唆している。

さて、shift-up の高分子合成に対する効果が分離した原因を考えると、第1にリボゾームの変化が考えられる。しかし図9に示すように、30Sおよび50S サブユニットとして見る限り、CRK4001 と168W との間には差を見いだすことはできない。第2に、CR

K4001 の対数増殖期での purA/metB 比がもっとも rich なLp培地においてさえ2.0を超えることがなかったという事実から、この変異株では premature initiation が阻害されている可能性が考えられる。しかし、表3の結果はこの可能性を否定する。即ち、CRK4001 の対数増殖期の培養液に 6 HPUra あるいは nalidixic acid を添加し、50分間 DNA 合成を止めたのち、阻害剤を取り除いて DNA 合成を再開させると、purA/metB 比はただちに3.0を超え、その後徐々に培地に固有な1.6へと減少していった。このように、DNA 合成を阻害し initiation potential を蓄積した場合には、変異株においても premature initiation が可能なことは明らかである。

以上のことを考慮するとき、CRK4001 において、shift 後の DNA 複製開始頻度の増加が著しく抑えられることは rich な培地においてさえも十分に initiation potential を蓄積できないことと深く関連があるように思われる。

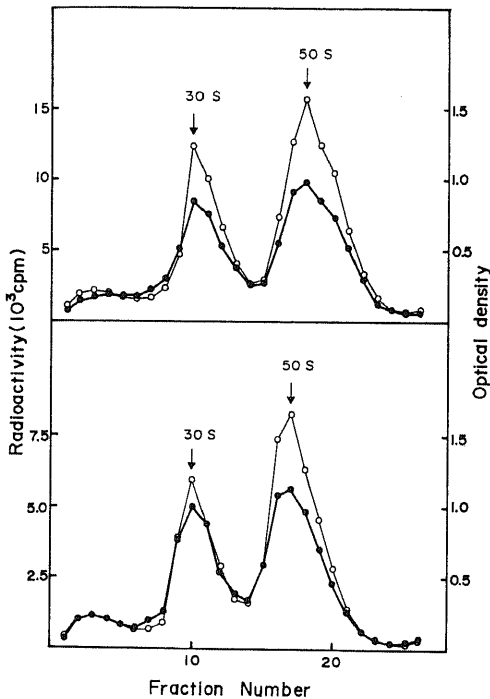


Fig. 9 リボゾーム subunit のショ糖密度勾配遠心パターン

実験方法で述べたように、168W (上図)およびCRK4001 (下図)を <sup>3</sup>H-Uracil (1 μCi/20 μg/ml) を含む培地C<sup>A</sup>で増殖させ、ribosomal pellet を調製した。これを0.7 ml の0.05 mM TM 緩衝液 (5 mM Tris-HCl, 0.05 mM Mg-acetate pH 7.2) に懸濁し、同様の緩衝液600 ml に対し3度透析を行なった。0.5 ml をあらかじめ0.05 mM TM 緩衝液を用いて作成した5%~20% (w/v) ショ糖密度勾配遠心管上部にのせ、Beckman SW40ローターにより33,000 rpm 4時間 (4°C) の遠心後上部より0.4 ml ずつ分画を行ない、OD<sub>260</sub> と <sup>3</sup>H 放射能を測定した。OD<sub>260</sub>: ○—○; <sup>3</sup>H 放射能: ●—●

Table 3 Premature initiation by CRK4001 cells after temporary inhibition of DNA synthesis<sup>a</sup>

Time (min) <sup>b</sup>	Inhibitors	
	6HPUra	Nalidixic acid
normalized purA/metB		
-60	1.68	1.62
-30	1.69	1.63
0	1.72	1.59
30	1.92	1.83
50	1.76	1.50
60	2.28	4.25
70	3.31	3.78
85	3.12	—
95	—	2.19
115	1.65	—

a) CRK 4001 を培地C で Klett が10になるまで増殖させた。直ちに6 HPUra (70 μM) あるいは nalidixic acid (20 μg/ml) を添加し50分間処理したのち、濾過により薬剤を除去し、同じ新しい培地に懸濁したのち、そのまま培養を続けた。各時間に10ml 培養液を採取し、DNA を抽出したのち、purA/metB 比を決定した。b) 時間は薬剤添加の時点をも0 time として表示された。薬剤は50分目に除去され、細胞は55分目に同じ新しい培地に懸濁された。

## 考 察

親株の 168W においては, nutritional shift-up 後の stable RNA 合成速度は shift 後10分から15分以内に shift 後の培地に固有な速度に到達したが, DNA 合成速度は shift 後約30分程して shift 後の培地に固有な速度に達した. 本研究の目的は, これら2つの高分子合成速度の制御が相互にどのように依存しているかを調べることであった.

1. 2つの変異株 CRK4001 および NIG45 においては, shift 後の stable RNA 合成は DNA 合成との関連において2つの stage に分離された. さて, 168W および CRK4001 における shift-up 後の RNA 合成速度, DNA 合成速度および DNA 複製開始頻度の相対的变化を図式的に図10に示すが, いずれの株においても, シフト後の stable RNA 合成速度の最終レベルはシフト後の培地に固有な DNA 合成速度と一致することがわかる. ところで, shift-up の stable RNA 合成および DNA 合成に及ぼす効果の著しい違いが CRK4001 および NIG45 においてシフト後の最初の60分間に観察された. すなわち, 図10に示すように, CRK4001 のシフト後の stable RNA 合成速度は 168W の場合と全く同じ程度に増加したが, 60分目には急激にシフト後の培地に固有の速度に減少していった.

一方 DNA 合成に関しては, このような変化は決して観察されなかった. ここで注目すべきことは, stable RNA 合成速度が低下する時期と DNA 複製開始頻度がシフト後の培地に固有な値に達する時期とが一致していることである. このように, CRK4001 で観察された結果は, シフト後の stable RNA 合成は最初の60分間は DNA 合成に依存しないが (stage I), その後は DNA 合成速度に依存する (stage II) ことを示している. 今のところ, 60分目に stable RNA 合成速度が急激に低下することの明白な説明はない. しかし, この低下がシフト前の培地で DNA 複製を開始した最後の複製点がシフト後にその複製サイクルを完了する時期と一致するという事実は, stable RNA 合成の制御に果たす DNA 複製サイクルの重要性を示唆するものである.

ところで, DNA 合成との関係において, シフト後の stable RNA 合成が2つの stage に分離されるという変異株を使つての上述の結論は親株の 168W においても示すことができた. 図4および図5に示すように, 対数増殖期の培養において DNA 複製を阻害した場合, stable RNA 合成速度はただちに

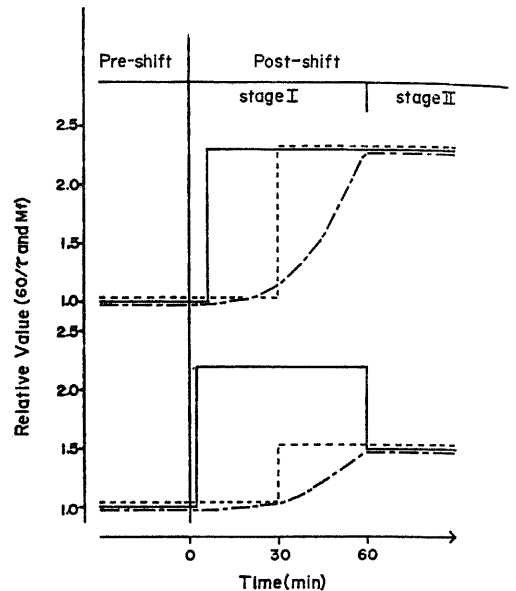


Fig. 10 nutritional shift-up 後の高分子合成速度および遺伝子頻度: その図式的説明

培地Cから培地Cへのshift-up前後の stable RNA 合成速度, DNA 合成速度, および遺伝子頻度 (purA/metB) の相対値を図式的に示した. 速度は  $60/\text{doubling time}$  で表示され, 図1, 図3および図8の結果から算出された. 遺伝子頻度は図8の結果を利用した. また値は, 168W (上図) および CRK4001 (下図) のシフト前の培地Cでのそれぞれの値を1.0として表示された. なお, purA/metB の相対値は更に, この最終レベルが DNA および RNA 合成の最終レベルと一致するように補正された.

exponential から linear に変化した. このことは 6HPUra による DNA 合成の停止後直ちに stable RNA 合成のための initiation site の数が固定化されたことを意味する. この原因として第1に, 対数増殖期には RNA ポリメラーゼが DNA template 上に飽和状態で存在していることが考えられるが, この可能性は全く同様の現象がもっとも poor な C 培地においてもみられることから除外される. 第2に, DNA 合成が行なわれない状態では, RNA ポリメラーゼの合成も阻害されることが考えられる.

さて, 6HPUra の stable RNA 合成に対する上述の現象と全く異なる現象は Shift-up 後の最初の60分間に観察された. 即ち, 6HPUra の添加とは無関係にシフト後60分までは増加した exponential な合成速度が維持された. このことは, シフト後60分までに見られる stable RNA 合成は DNA 合成に依存

していないことを改めて明示するものである。ところで、RNA ポリメラーゼがこのシフト後の stable RNA 合成速度の変化に関与しているとするれば、DNA 複製が停止された場合でも RNA ポリメラーゼの合成は阻害されないように調節されているものと考えられる。

2. ビューロマイシンあるいはクロラムフェニコールの実験結果から、nutritional shift-up 後の stable RNA 合成速度の増加は蛋白質合成に依存していることが明らかになった。この結果は Maaløe ら<sup>9)</sup>の報告とは相反するが、石浜ら<sup>28)</sup>の最近の知見、即ち、RNA ポリメラーゼ合成の differential rate は shift-up 後ただちに増加するという観察とはよく一致する。ところで、この stable RNA 合成速度の増加に必要な蛋白質合成は必ずしも RNA ポリメラーゼ自身の合成を意味するものではなく、stable RNA の transcription を選択的に促進する各種 factor<sup>27)</sup>の可能性も考えられる。

3. DNA 合成速度はシフト後約30分目に増加し始めたが、DNA 複製開始頻度はシフト後直ちに対数的な増加を示した。ところで、Bleecken<sup>13)</sup>によるこのような増加の kinetics についての分析は、シフト後の DNA 合成速度が DNA 複製開始頻度の増加によって直接的に制御されていることを指摘してきた。一方、initiator accumulation theory によれば、DNA 複製開始頻度は initiator 蛋白質の蓄積速度によって調節されている。それ故に、シフト後の initiator 蛋白質の合成速度の増加はリボソーム合成の増加に依存しているとも考えられる<sup>13)15)</sup>。しかし、CRK 4001 を使っての実験は、stable RNA 合成の増加が DNA 複製開始頻度をこの RNA 合成のレベルにまで増加しえないことを明らかにした。即ち、図2に示すように、シフト後の stable RNA 合成の増加は mature ribosome の増加を反映しているので、結局のところリボソームの増加だけでは DNA 複製開始頻度の増加を説明しえないことになる。この場合、CRK4001 においては、シフト後に合成されるリボソームは initiator 蛋白質を合成するために十分に機能していないという可能性が考えられる。しかし、stable RNA 合成の shift-up に対する反応は 168W と全く同じ程度に起っていることから、effector 分子は 168W の場合と同様に充分効果的に細胞内に透過しているものと考えられる。従って、むしろもう一つの可能性、即ち、initiator 蛋白質の合成はおそらく transcription のレベルで直接的に培地の変化によって制御されているという考えを追求

すべきだと考えている。

4. NIG45 はシフト後の stable RNA 合成を見る限り、CRK4001 と同じ態度を示した。また、シフト後の DNA 合成速度の増加は低く抑えられたが、これは表1に示すように、染色体複製の1サイクルを完了するのに要する時間 C が rich な培地ほど増加していることと関係しているように思われる。即ち、NIG45 が持つ *rec<sup>-</sup>* の性質に基因するかもしれない。*rec<sup>-</sup>* の細胞においては、培地が rich なるほど DNA 上の損傷が増加し、これを修復するために必要な時間だけ C が増加するものと考えられる。また DNA 上の損傷の修復と DNA 複製開始とが一部に共通な成分を必要とすると考え、この分だけ DNA 複製開始頻度は低下することになる。

## 結 語

1. 枯草菌の親株と2株の変異株 CRK4001 および NIG45 を使って nutritional shift-up 後の高分子合成について研究した。これらの変異株は rich な培地においても遅い生育速度しか獲得しえなかった。CRK4001 の場合、initiation potential が蓄積されたときには、通常の premature initiation が起ったにもかかわらず、対数増殖期での *purA/metB* 比はもっとも rich な培地においても2.0を超えることはなかった。NIG45 は *rec<sup>-</sup>* の変異株であるが、これは、生育培地が rich になるにつれて、DNA 複製点の合成速度も遅くなるという性質を示した。

2. 親株の場合、stable RNA は shift 後直ちに shift 後の培地に固有な速度で蓄積し始めたが、蛋白質および DNA 合成は shift 後約30分目に増加した。変異株の場合、stable RNA 合成速度は shift 後の最初60分間は一時的ではあったが shift 後の培地に固有の速度よりも速かった。しかし、それ以降は急激に shift 後の培地に固有な速度に落ちていった。一方、DNA 合成は直接、shift 後の培地に固有な速度に至達した。また DNA 合成阻害に対する感受性の違いから、親株においても、shift 後60分までの stable RNA 合成はそれ以降の RNA 合成と区別することができた。なお、stable RNA 合成はリボソーム合成を反映するものであった。

3. shift 後の stable RNA 合成速度の急激な増加はビューロマイシンおよびクロラムフェニコールで抑えられた。また shift-up の際の stable RNA 合成が示す蛋白質合成依存性は10分以内に完了した。

4. shift 後の DNA 複製開始頻度の変化を親株お

よび CRK4001 で調べた。いずれの場合も、複製開始頻度は shift 後直ちに対数的に増加を始め、60分後に shift 後の培地に固有な値に達した。また、この60分目という時期は、変異株において stable RNA 合成速度が急激に低下する時期でもある。なお CRK4001 においては、複製開始頻度の増加は著しく抑えられた。

これらの結果にもとづき、nutritional shift-up 後の stable RNA 合成制御と DNA 合成制御との相互依存性について考察を試みた。

稿を終るにあたり、終始御指導をいただいた、吉川寛教授をはじめ適切な助言をいただいた同研究室の村上清史博士、山口和男博士に心から感謝致します。

#### 文 献

- 1) **Schaechter, M., Maaløe, O. & Kjeldgaard, N. O.** : J. Gen. Microbiol., **19**, 592 (1958).
- 2) **Neidhardt, F. C. & Magasanik, B.** : Biochim. Biophys. Acta., **42**, 99 (1960).
- 3) **Ecker, R. E. & Schaechter, M.** : Biochim. Biophys. Acta., **76**, 275 (1962).
- 4) **Maaløe, O. & Kjeldgaard, N. O.** : Control of macromolecular syntheses. New York and Amsterdam, W. A. Benjamin, Inc., 1966.
- 5) **Schleif, R. F.** : J. Mol. Biol., **27**, 41 (1967).
- 6) **Maaløe, O.** : Develop. Biol. Supp., **3**, 33 (1969).
- 7) **Herbert, D.** : In recent progress in microbiology. Springfield, III, G. Tunevall, editor. Charles, C. Thomas, Publisher, 381, 1959.
- 8) **Leick, V.** : Nature (Lond.), **217**, 1153 (1968).
- 9) **Kubitschek, H. E. & Freedman, M. L.** : J. Bacteriol., **107**, 95 (1971).
- 10) **Kubitschek, H. E.** : Biophysical Journal, **14**, 119 (1974).
- 11) **Yoshikawa, H., O'Sullivan, A. & Sueoka, N.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **52**, 973 (1964).
- 12) **Helmstetter, C. E., Cooper, S., Pierucci, O. & Revalas, E.** : Cold Spring Harbor symp. Quant. Biol., **33**, 809 (1968).
- 13) **Bleecken, S.** : J. Theoret. Biol., **25**, 137 (1969).
- 14) **Pritchard, R. H., Barth, P. T. & Collins, J.** : Symp. Soc. Gen. Microbiol., **19**, 263 (1969).
- 15) **Sompayrac, L. & Maaløe, O.** : Nature New Biol., **241**, 133 (1973).
- 16) **Yoshikawa, H. & Sueoka, N.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **49**, 559 (1963).
- 17) **Sueoka, N. & Yoshikawa, H.** : Genetics, **52**, 747 (1965).
- 18) **Sadaie, Y. & Kada, T.** : in press (1974).
- 19) **Yoshikawa, H.** : Genetics, **54**, 1201 (1966).
- 20) **Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.** : J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
- 21) **Saito, H. & Miura, K. I.** : Biochim. Biophys. Acta., **72**, 619 (1963).
- 22) **Hass, M. & Yoshikawa, H.** : J. Virol., **3**, 248 (1969).
- 23) **Ephrati-Elizur, E. & Borenstein, S.** : J. Bacteriol., **106**, 58 (1971).
- 24) **Harvey, R. J.** : J. Bacteriol., **101**, 574 (1970).
- 25) **Mackenzie, J. M., Neville, M. N., Wright, G. E. & Brown, N. C.** : Proc. Nat. Acad. Sci., **70**, 512 (1973).
- 26) **Ishihama, A., Ito, K., Iwakura, Y. & Taketo, M.** : Molecular Biology Meeting of Japan: Macromolecular assemblies and nucleic acid 9. (1974).
- 27) **Travers, A., Kamen, R. & Cashel, M.** : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **35**, 415 (1970).

#### Abstract

Macromolecular synthesis after a nutritional shift-up was investigated using a wild type cell of *Bacillus subtilis* and two mutant derivatives, CRK4001 and NIG45, whose growth rates are slow even in rich media. PurA/metB of exponentially growing cells of CRK4001 remained at less than 2.0 even in the richest medium despite the fact that the premature initiation occurred normally when the initiation

potential was accumulated. NIG45 is a *rec<sup>-</sup>* mutant and showed the slower DNA chain elongation rates when the richer media were used.

In the wild type cell, stable RNA began to accumulate at a rate characteristic of the post-shift steady state growth shortly after the shift, while the rate of protein and DNA synthesis increased approximately in 30 min. after the shift. In the mutant cells, the rate of stable RNA synthesis increased to the rate much higher than that of the post-shift steady state growth temporarily for 60 min. after the shift and then suddenly decreased to the rate characteristic of the post-shift medium. DNA synthesis, on the other hand, increased directly to the rate characteristic of the post-shift medium. The stable RNA synthesis by the wild type cell during the first 60 min. after the shift was also distinguishable from that of the later stage in its sensitivity to the inhibition of DNA synthesis. The stable RNA synthesis could be regarded as it reflected ribosome synthesis.

The rapid increase in the rate of the stable RNA synthesis after the shift was completely prevented by puromycin and chloramphenicol. Moreover, the adaptation of the rate of the stable RNA synthesis to a richer medium was found to complete within 10 min..

Changes in initiation frequencies of DNA replication after the shift were determined in CRK4001 as well as in the wild type cell. In both cells, initiation frequencies began to increase exponentially immediately after the shift and reached to the ones characteristic of the post-shift steady state in 60 min. after the shift which coincided with the time when the drop of the rate of the stable RNA synthesis was observed in mutant cells. In CRK4001 the increase in the initiation frequency was markedly reduced.

From these results interdependency between the regulation of stable RNA and DNA synthesis following the nutritional shift-up was discussed.

---