

## T偶数バクテリオファージ感染大腸菌に おけるメッセンジャー RNA 合成の調節\*

松 影 昭 夫

受付：昭和44年1月16日

### REGULATION OF MESSENGER RNA SYNTHESIS IN *ESCHERICHIA COLI* INFECTED WITH T-EVEN BACTERIOPHAGE

Akio MATSUKAGE

Received for publication, January, 16, 1969

**Abstracts.**—Sequential synthesis of T2 and T4 phage mRNA's was analyzed quantitatively by the DNA-RNA hybridization competition technique and by the phenotypic reversion of amber mutants of T4 by 5-fluorouracil. The results obtained are summarized as follows;

- 1) Phage mRNA's can be divided into three groups, eI-, eII- and l-RNA's. The synthesis of eI-RNA starts at an early period of infection and ceases after a certain while, whereas that of eII-RNA begins early after infection and continues through the late phase. The synthesis of l-RNA occurs at a later time than that of either the eI-RNA or the eII-RNA. These results are compatible with the sequential synthesis of phage-directed proteins reported by other workers.
- 2) For the early cessation of eI-RNA synthesis and for the initiation of l-RNA synthesis, each specific protein is required, respectively.
- 3) The mechanism which controls the l-RNA synthesis operates between 2 and 5 min after infection, and conditions for the diminution of eI-RNA synthesis are furnished between 5 and 15 min after infection. It is suggested that these two processes are controlled by different mechanisms.
- 4) In the presence of chloramphenicol, only a part of the early RNA was synthesized. Finally, the regulatory mechanisms of mRNA synthesis been discussed on the basis of these results.

金沢大学がん研究所分子生物学部門（主任：亀山忠典教授）

Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, (Head : Prof. Tadanori Kameyama)

\* この研究の大部分は著者が京都大学理学部植物学教室の大学院博士課程において行なったものである。

## 緒 言

T偶数ファージ (T2, T4, T6) の *Escherichia coli* (*E. coli* と略す) にたいする感染系にみられる逐次的な遺伝情報の発現は, 高等生物の発生の際にみられるそれとは, 必ずしも同じ機構に基づいているとは見なすことはできないにしても, 前者の詳細な研究は, 単にファージ感染系のみには止まらず, 後者の解明にも重要な示唆を与えるものになるであろう。

T偶数ファージの感染は宿主である *E. coli* の細胞壁に対する吸着にはじまり, DNA の注入がそれに続く。感染して短時間後に宿主の高分子合成反応は停止し, ファージ DNA に支配されて, メッセンジャーRNA (mRNA) 合成を経て, ファージに特異的なタンパク, DNA が合成される。これらのうち, DNA と外被を構成する構造タンパクが会合し, 子ファージが完成し, 宿主菌を溶菌せしめて放出され, 1回の成長サイクルが終了する<sup>1,2)</sup>。この感染過程にみられる各素反応は, 時間経過にしたがって厳密に進行する。図1にまとめたように, 感染直後に合成が開始されるタンパクの大部分

は, ファージ特異的な DNA 合成に関与するもので, 感染後約12分ごろ, その合成は停止し, 初期タンパクとよばれる<sup>3-10)</sup>。一方, 5分\*ごろに開始するファージ DNA 合成に遅れて, 合成が開始し, 溶菌時まで継続するタンパク (後期タンパク) は大部分, 子ファージの外被を構成する構造タンパク<sup>11,12)</sup>であり, また宿主菌の溶菌に必要なリゾチームもこのグループに入れられる<sup>13)</sup>。以上の2つのグループに属さない例外の1つは内部タンパク (internal protein) で, その合成は初期に開始するにもかかわらず, 後期になっても停止が起こらない<sup>14,15)</sup>。同様の逐次的な遺伝情報の発現は, テンプレートファージの $\lambda$ <sup>16-18)</sup>, さらには動物ウィルス<sup>19)</sup>などの感染菌でも観察されており, ウィルス成長過程に普遍的な現象と思われる。このようにT偶数ファージ感染系をタンパク合成のレベルで見ると, 誘導および抑制の2通りの調節機構が存在する。他方, mRNA 合成については, まず Hershey<sup>20)</sup>, ならびに, Volkin と Astrachan<sup>21)</sup>がファージに特異的な RNA 合成

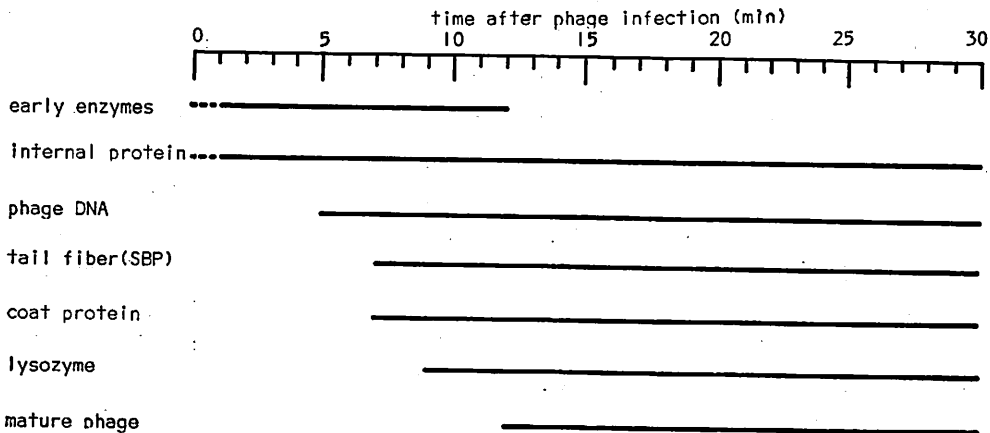


Fig. 1 Sequential synthesis of T-even bacteriophage specific proteins and DNA. SBP stands for serum blocking power.

\* 今後ことわらないかぎり, ファージ懸濁液を *E. coli* 培養に混入する時間を0分として表わす。

を証明して以来、多くの研究が相続いて行なわれた。何人かの研究者は感染の初期および後期に合成される mRNA が質的に異なることを示唆した<sup>22,23</sup>。Hall<sup>24</sup>らは、後期(15—19分)には初期(0—5分)に合成される RNA (初期 RNA) とは別種の RNA (後期 RNA) が合成されることを確認し、逐次的な遺伝情報の発現が転写 (transcription) レベルでも行なわれていることを証明し、後期タンパクとの対応関係は重要な示唆を与えた。ここで問題点が次のように整理される。

1) 以上の観察の他に、初期タンパク合成の停止に対応する初期 RNA 合成の停止があるか否か。

2) このような逐次反応を支配する実体は何か。β-ガラクトシダーゼ合成の抑制やテンペレートファージの溶原化に機能するタンパクと考えられる、リプレッサーと同様のものを想定し得るだろうか。

3) 初期および後期 RNA は、それぞれ、初期および後期タンパクに対応しているのか。言いかえれば、遺伝子発現が転写レベルで行なわれているか、翻訳 (translation) レベルで行なわれているのか。

以上のような問題の解明をめざし、タンパク合成と関係して RNA 合成の質的な解析を行なった。

### 実験材料および実験方法

#### 1. 実験材料

1) バクテリア: *Escherichia coli* H株, Hトリプトファン要求株 (*try*<sup>-</sup>), Bウラシル, アルギニン, トリプトファン要求株 (*U-arg-try*<sup>-</sup>), および CR63株, 両 *try*<sup>-</sup>株は各々, H および *BU-arg* より N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 処理による突然変異誘導後<sup>25</sup>, レプリカ法によって単離したものである。

2) ファージ: T 2 H, T 4 D いずれも野生型, T 4 amber変異株, N82 (第44遺伝子), N122 (第42遺伝子), B17 (第23遺伝子), N91 (第37遺伝子) は Edgar より送られたものである。

#### 3) 培地

a. M9 合成培地: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 18.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g を脱イオン水 1 l に溶解したものを高圧滅菌した後, その 100ml に別に滅菌した 40% ブドウ糖液 0.5ml, 1 M MgSO<sub>4</sub> 0.1ml, 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 0.1ml を加える。

b. M9 AA培地: 上記に 0.025% カザミノ酸を加える。

c. トリス・ブドウ糖 (TG) 培地<sup>26</sup>: 1 M トリス-HCl緩衝液 (pH7.4) 100ml, NaCl 5.4g, NH<sub>4</sub>Cl 1.1g, KCl 3g, CaCl<sub>2</sub> 150mg, MgCl<sub>2</sub> 2g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 87mg に

蒸留水を加え 1 l にしたものを 100°C で 30分滅菌した後, 40% ブドウ糖溶液を 100ml あたり 0.5ml 加えたもの。

d. 低リン酸濃度 TG 培地<sup>26</sup>: 上記の TG 培地のリン酸濃度 0.64mM を 0.1mM とした。

e. ペプトン・ブドウ糖 (PG) 培地: ポリペプトン 10g, NaCl 3g, 1 M MgSO<sub>4</sub> 1ml, ブドウ糖 1g を脱イオン水 1 l にとかし, 1 N NaOH で pH を 7.4 に合わせ高圧滅菌する。

f. PG 寒天固型培地: 上の PG 培地 1 l 当り 10g の粉末寒天 (半井薬品製) を加え滅菌後, 25~30ml を直径 9 cm のシャーレに広げて作成した。

g. トリプトン軟寒天培地: トリプトン 10g, NaCl 5g, ブドウ糖 1g, 粉末寒天 5g も脱イオン水 1 l にとかし, 1 N NaOH で pH を 7.4 に合わせ高圧滅菌した。

4) <sup>32</sup>P-オルトリン酸: 日本放射性同位元素協会より購入した。

5) 脾臓リボスクレアーゼ (RNase) およびデオキシリボスクレアーゼ (DNase): Worthington社のものを使用した。

6) リゾチーム: シグマ社のものを使用した。

7) 阻害剤

a クロラムフェニコール (CM) : 三共薬品社のものを使用した。

b 7-アザトリプトファン (AT) : シグマ社のものを使用した。

8) 仔牛胸腺 DNA : シグマ社のものを使用した。

9) ミリポアフィルター : HA45, 孔径 0.45  $\mu$ 。

## 2 実験方法

1) ファージストックの調製 : 野生型ファージは, M9 または TG 培地を用い, 37°C で培養した *E. coli* H に感染させ, 通気培養し, クロロフォルム処理で得た溶菌液をハイフロッサーセル隔を通過させ, 細菌破片などを除去した後, 分画遠心を 3 回くりかえして精製した。amber 変異株は, PG 培地を用い 30°C で培養した *E. coli* CR63 に感染させ, 上と同様に調製した。ファージ粒子数の測定は軟寒天重層法<sup>1)</sup>によった。

2) DNA の調製および熱変性 : *E. coli* DNA は, *E. coli* H 株より Marmur の方法<sup>27)</sup>によって調製した。ファージ DNA は精製したファージストックをフェノール処理し<sup>28)</sup>, エーテルでフェノールを除き,  $N_2$  ガスでエーテルを除去した後エタノールで沈澱とし保存した。

3) ファージ感染 *E. coli* からの  $^{32}P$  標識 RNA ( $^{32}P$ -RNA) の調製 : TG 培地で一夜培養した H 株の前培養を 20 倍容の同じ培地に移し, 37°C で 2.5 時間通気すると約  $5 \times 10^8$ /ml の菌数を得る。遠心 (6000rpm  $\times$  10 分) で集菌し, 1/2 容の低リン酸濃度 TG 培地に懸濁し, さらに菌体内のリン酸濃度を下げるために 30 分通気する。この低リン酸濃度 TG 培地を用いてもファージの感染過程は, ほぼ正常に進行する。例えば, 初期タンパクの 1 つであるデオキシシチジントリフオスファターゼ (dCTPase) の合成と停止は TG 培地中と同じ時間に起こる。また後期タンパクのリゾチームも通常の TG 培地によると同様少なくとも 50 分までは合成が続く。この低リン酸濃度 TG 培地を用いることにより, 高い放射性活性をもつ  $^{32}P$ -RNA を得ることが可能になる。

30 分通気の後, *E. coli* 1 細胞当たり 10 粒子のファージを感染させ (この時間を 0 分とする), 目的の時間  $^{32}P$ -オルトリン酸を 60  $\mu$ C/ml となるように加え RNA を標識する。標識時間終了後に 1/5 容の 10mM トリス-HCl (pH7.4), 10mM  $MgCl_2$ , 60mM  $NaN_3$  を含む溶液からなる砕いた氷の上に注ぎ, 高分子合成を瞬時的に停止せしめる。菌は冷凍遠心 (10000rpm  $\times$  5 分) で集め, 初めの培養の約 1/50 容の上記の溶液に懸濁し, 5  $\mu$ g/ml DNase と 200  $\mu$ g/ml リゾチームを加える。ドライアイス-アセトン混液および 37°C 温浴中で, 凍結, 融解を 3 回くりかえし, 0.4% ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) を加えて溶菌し, 室温で 2 回フェノール処理を行い除タンパクし, RNA を抽出する。2 回目の水層に 2 倍容の冷エタノールを加え RNA を沈澱させる。沈澱を 20mM KCl, 10mM  $MgCl_2$  を含む 20mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) に溶解し, 残存する DNA を DNase で分解し (10  $\mu$ g/ml, 37°C 15 分), エタノール沈澱で DNA 分解物を除去し, フェノール処理で DNase を除いた後, 20mM KCl を含む 20mM 酢酸緩衝液に一夜透析し, さらにもう一度エタノール沈澱を行う。RNA は少量の 0.5M KCl を含む 0.01M トリス-HCl (pH7.4) に溶解し, ミリポアフィルターを通過させた後, -20°C で保存する。

4) 未標識 RNA の調製 : 未標識 RNA は最後のミリポアフィルターによる濾過を除いて,  $^{32}P$ -RNA と同じ方法で調製した。

5) DNA-RNA 間のハイブリダイゼーション : ハイブリダイゼーションは Nygaard らの方法<sup>29)</sup>を用い, これに RNase 分解をつけ加え, ハイブリッド分子はミリポアフィルター上に集めた。反応液の組成および反応条件は各図説明に記す。

6) DNA, RNA の定量 : DNA および RNA はともに分光光度計で各溶液の 260m $\mu$  波長における吸光度を測定して定量した。1 mg の RNA は 23 吸光単位, DNA は 20 吸光単位とした。

## 結 果

## 1. 競合ハイブリダイゼーション法によるファージ mRNA 合成の逐次反応の解析

mRNA 合成の質的な解析を行なうために 2 つの方法を用いた。第 1 は DNA-RNA の競合ハイブリダイゼーション法<sup>24)</sup>であり、第 2 はファージの amber 変異株の 5-フロロウラシル (FU) による“みかけの回復<sup>30,31)</sup>”を測定する方法である。まず前者による解析を示す。

## 1) 後期 RNA 合成について

熱処理またはアルカリ性で変性した 1 本鎖 DNA を RNA と混ぜ、60°—70°C で数時間置くと、両者の間に相補的な塩基配列がある場合ハイブリッド分子が形成され、適当な方法でフリー状態の RNA と分離、測定できる。RNA を放射性同位元素 (<sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C など) で標識しておけば容易にハイブリッド分子の量を定量することができる。また、このように標識した RNA と DNA の間のハイブリダイゼーションの際に、大量の同質の未標識 RNA を加えると、DNA 上の結合部位をめぐって、両 RNA が競合し、標識 RNA はハイブリッド分子から排除される。一方、標識 RNA とはまったく異質の未標識 RNA を用いた場合は競合がなく、したがって未標識 RNA がない場合と同量の標識 RNA がハイブリッド分子を形成する。未標識 RNA が標識 RNA の一部の種類のみを含む場合は部分的な競合を示し、充分量の未標識 RNA を加えることにより、その組成に応じて、ハイブリッドする標識 RNA 量は一定の値に収束する。

競合ハイブリダイゼーションにおいては熱変性した DNA 1 に対し、<sup>32</sup>P-RNA 50, および、いろいろな量の未標識 RNA を 0.01M トリス HCl (pH7.4)—0.5M KCl (KCl-buffer) 中で混合し、67°C で 2—5 時間置いた。その後 10 μg/ml の RNase を加えてハイブリッド分子未形成の RNA を加水分解し、ミリポアフィルターによって濾過し、ハイブリッド分子を集め、さらに 60ml の KCl-buffer を通して洗ったうえ、乾燥して、G-M 計数管で放射能を測

定した。この条件では、未標識 RNA なしの場合用いた標識したファージ mRNA の 4—8% がハイブリッド分子を形成し、DNA なしのコントロール実験では 0.1% 程度にすぎない。図 2 は同質の <sup>32</sup>P 標識および未標識 RNA

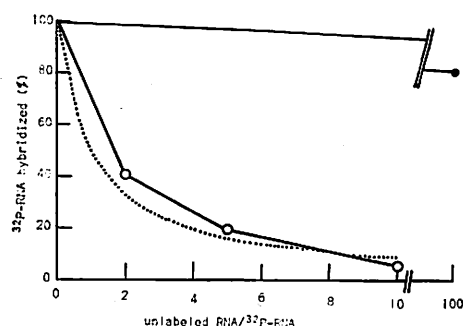


Fig. 2 Hybridization competition between <sup>32</sup>P-T2-RNA and unlabeled T2 or *E. coli* RNA. Hybridization mixture contains, in 0.5ml of 0.01M Tris·HCl (pH7.4)—0.5M KCl (KCl-buffer), denatured T2 DNA, 0.5μg; <sup>32</sup>P-RNA, 25μg; and varied amount of unlabeled RNA as competitor. The mixture was incubated, in a stop-cocked tube, at 67°C for 2hr. After incubation, unhybridized RNA was digested by pancreatic RNase (10μg/ml) at 37°C for 30min. The DNA-RNA complex was collected on a Millipore filter, and washed with 60ml of KCl-buffer. The filter was dried and the radioactivity was determined in a G-M counter. The radioactivities above the background value (no DNA added) are expressed in relative to the value obtained without unlabeled competitor RNA taken as 100. (O) <sup>32</sup>P-RNA labeled between 0.5 and 10min after phage infection (4100cpm/μg) versus unlabeled RNA prepared at 10min from T2 infected *E. coli* H; (.....) theoretical curve of hybridization competition between <sup>32</sup>P-RNA and unlabeled RNA containing identical components; (●) <sup>32</sup>P-RNA labeled 0.5 and 19min after T2 infection (3670cpm/μg) versus unlabeled *E. coli* RNA.

間の競合ハイブリダイゼーションの結果を示す。すなわち、<sup>32</sup>P-RNA は T2 ファージ感染後 0.5—10 分の間標識し、未標識 RNA は 10 分に調製したものである。<sup>32</sup>P-RNA は、大量の未標識 RNA を加えることにより、ハイブリ

Table 1. Hybridization between T2  $^{32}\text{P}$ -RNA and DNA's

$^{32}\text{P}$ -RNA	DNA		cpm in hybrid above the background value (no DNA)	% of input DNA
10 $\mu\text{g}$	T2	20 $\mu\text{g}$	1976	19.8
10	T4	20	1367	13.7
10	<i>E. coli</i>	20	40	0.40
10	calf thymus	20	9	0.09

Reaction mixture containing  $^{32}\text{P}$ -RNA (labeled between 0.5 and 10min after T2 phage infection, 1000cpm/ $\mu\text{g}$ ) and DNA in 0.5ml of KCl-buffer, incubated at 37°C for 2hr. Following procedures are the same as those given in the legend of Fig. 2.

ッド分子から完全に排除される。その様子は理論的な競合曲線とよく一致する。しかし、異質の未標識 *E. coli* RNA を用いた場合はハイブリッドを形成する  $^{32}\text{P}$ -RNA 量はほとんど影響を受けない (図2)。また、この  $^{32}\text{P}$ -RNA は *E. coli* DNA および仔牛胸腺 DNA とはハイブリッド分子を形成しない (表1)。このことからファージ感染菌では、もはや *E. coli* RNA は合成されていないことがわかる。

T2 ファージ感染後初期から後期まで、すなわち0.5—19分の間標識した  $^{32}\text{P}$ -RNA と4分に調製した未標識初期 RNA との競合は部分的であり、充分量の未標識 RNA を加えても、それがいない場合の約40%の  $^{32}\text{P}$ -RNA はハイブリッド分子として残る (図3)。このレベルは15—19分標識した  $^{32}\text{P}$ -RNA を用いた場合とほぼ等しい (図3)。しかしながら  $^{32}\text{P}$ -RNA として0.5—15分標識したものをを用いると、このレベルが約20%となる (図3)。この差は、すでに報告した論文<sup>26)</sup>および、この論文の後にも述べるように、初期に合成が開始された RNA の一部の合成が停止することに由来することが証明されている。さらに、この差が15分から19分の間に新しい RNA 種の合成が開始されたのでないことは15分に調製した未標識 RNA が15—19分標識した  $^{32}\text{P}$ -RNA を完全にハイブリッド分子から排除する (図3) ことによって示される。これらの結果は Hall<sup>24)</sup>らの結果と同じく、感染後期には、初期に存在しなかった種類の RNA が合成されることを意味する。

この種の RNA は後期 RNA とよばれ、後期タンパクの mRNA と考えられる。一方、感染初期に合成される RNA は初期 RNA とよばれる。後期 RNA 合成が開始される時間は6—7分と報告され<sup>24)</sup>、また後に示す実験によってもその結果が裏づけられる。6—7分は、また、後期タンパク (外被タンパク) の合成が

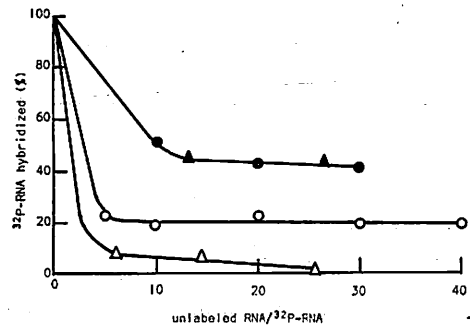


Fig. 3 Evidence for the synthesis of late RNA. Hybridization competition between late  $^{32}\text{P}$ -RNA's and unlabeled early or late RNA's were carried out in 0.3ml of mixture containing denatured T2 DNA, 0.2 $\mu\text{g}$ ;  $^{32}\text{P}$ -RNA, 10 $\mu\text{g}$ ; and varied amount of unlabeled RNA. Procedures and conditions are the same as those given in the legend of Fig. 2. (▲)  $^{32}\text{P}$ -RNA (labeled between 15 and 19min, 19500cpm/ $\mu\text{g}$ ) versus unlabeled early RNA prepared at 4min (4min-RNA); (●)  $^{32}\text{P}$ -RNA (0.5-19min, 5300 cpm/ $\mu\text{g}$ ) versus unlabeled 4min-RNA; (○)  $^{32}\text{P}$ -RNA (0.5-15min, 3670cpm/ $\mu\text{g}$ ) versus 4min-RNA; (△)  $^{32}\text{P}$ -RNA (15-19min, 19500cpm/ $\mu\text{g}$ ) versus late RNA prepared at 15min; all RNA's were prepared from T2 infected *E. coli* H.

開始する時間とも一致する。

## 2) 一部の初期 RNA 合成の停止

初期タンパク合成の停止に対応する初期 RNA 合成の停止があるか否かを知るために、次の実験を行なった。mRNA は代謝回転が早いことが知られる<sup>32)</sup>ので、もし初期 RNA の一部の合成が、ある時間に停止すると、かなり速やかに分解されると予想される。ある種の mRNA 合成が15分に停止し、半減期2分で分解すると仮定すると40分には、その mRNA は5000分の1 ( $= 2^{-\frac{40-15}{2}}$ ) しか残存しないことになる。この考えに基づいて、第1次ファージ感染の後、溶菌を防ぐために10分に同じ多重度で2次感染<sup>33)</sup>した菌から60分に未標識 RNA (60分RNA) を調製した。この RNA と0.5—4分標識した初期<sup>32</sup>P-RNA との間で競合ハ

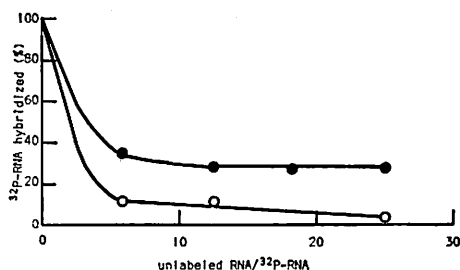


Fig. 4 Hybridization competitions between early or late <sup>32</sup>P-RNA's and unlabeled late RNA, showing [partial] cessation of early RNA synthesis. Experiments were performed as described in the legend for Fig. 3. Unlabeled late RNA (60min RNA) was prepared from *E. coli* H which had been infected at 0 min and superinfected at 10 min with T2 phage at a multiplicity of 10 respectively. (●) <sup>32</sup>P-RNA (0.5-4min, 1770cpm/μg), (○) <sup>32</sup>P-RNA (15-19min, 19000cpm/μg).

イブリダイゼーションを行なった結果を示したのが図4である。競合は部分的であり、60分RNA はもはや初期 RNA の一部を欠いていることがわかる。しかしながらこの60分RNA は後期に標識した<sup>32</sup>P-RNA (15—19分標識) に対しては完全な競合を示す(図4)ので、60分RNA は15—19分の間に合成されるすべてのRNA 種を含んでいる。いいかえれば、一

部の初期 RNA 合成の停止は15分以前に起こっていると結論される。また初期に合成が開始した RNA の一部が後期まで継続することは、ある種のタンパク (たとえば内部タンパク)<sup>15, 16)</sup>の合成が初期から溶菌時まで続くことで示唆されているが、図3にみられるように初期未標識 RNA が後期<sup>32</sup>P-RNA (15—19分標識) と部分的に競合することによって証明される。

以上 1), 2) に示した結果からファージ mRNA はその合成の様式によって3つの範疇に分けられることが結論される。すなわちそれらは、1) 初期に合成が開始し15分以前の一定の時に停止するもの (eI-RNA とよぶ)、2) 初期から溶菌時まで合成が継続するもの (eII-RNA)、および、3) 感染後一定時に、はじめて合成が開始する後期 RNA (I-RNA) であり、ファージタンパクの合成における逐次反応の様子と見かけ上の一致を示す。

## 2. T4 amber 変異株 (am変異株) の5-フロロウラシルによる“見かけの回復 (FU回復)”を利用した mRNA 合成の解析

T4の am 変異株の FU 回復を調べることにより、mRNA については直接的ではないが、遺伝子とはより直接的に関連した形質発現過程を追求することができる。この実験の原理は、Champe と Benzer<sup>30)</sup>により発見されたもので、次に要約する。ある遺伝子上に変異が起こり、これを転写した mRNA 上の塩基がシトシン (C) からウラシル (U) へと変換し、その結果正常なタンパクが合成されなくなった菌を想定する。この菌の培地中にFUを入れると、これはUのかわりに mRNA へ取り込まれ、それが翻訳の際にCと読まれることがあり、その結果として、ときどき活性あるタンパクが合成され、見かけ上変異した機能が回復する。すなわち、FU回復はFU存在下で、変異した遺伝子の mRNA が合成されていることを意味する。T4 am変異株はあるコドンがナンセンスコドン (UAG) に変化したもので、*E. coli* B株や H株 (nonpermissive host) ではこの場所でタンパク合成が停止するが、抑制遺伝子

swIII をもつ K12 CR63 株 (permissive host) では UAG がチロジンと読まれるためタンパク合成が進み子ファージ産生も行なわれる<sup>34)</sup>. T4 am 変異株のあるものは, FU 存在下で B 株または H 株でもファージ産生を行なうようになり, FU 回復をすることが知られる<sup>31)</sup>.

初期遺伝子に am 変異がある N82, N122, および後期遺伝子にある, B17, N91, の FU 回復を経時的に測定した結果を図 5 に示す.

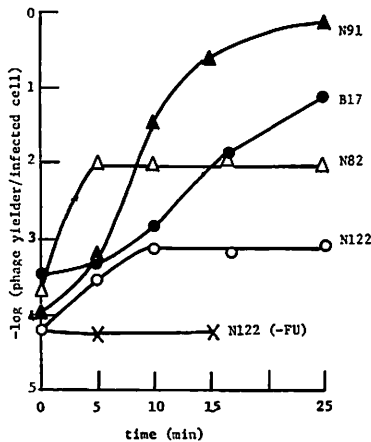


Fig. 5 Phenotypic reversion of T4 amber mutants by 5-fluorouracil. Cells of *E. coli* H (a nonpermissive host) grown in M9AA were infected with one of the mutants at multiplicity of 0.1 in the presence of  $2 \times 10^{-2}$  M KCN, and unadsorbed phage particles were removed by addition of anti T4-serum followed by centrifugation in the cold. Pellet was suspended in chilled M9AA, added 20  $\mu$ g/ml of 5-fluoro uracil (FU) and 100  $\mu$ g/ml of thymidine, and incubated at 37°C (time 0). The incubated cells were sampled at intervals, mixed with CR63 cells (a permissive host) in small tube containing soft agar, 100  $\mu$ g/ml of uracil after appropriate dilution, and poured on plates.

FU に対する感度に相違はあるが, 前二者は FU を入れた直後から高い頻度で回復し, 5—10 分の間に回復が止まる. 一方, 後二者では回復が前者にくらべて遅れてあらわれ, 回復は持続する. このことは初期遺伝子に対応する mRNA が初期に合成開始し, その後停止があること, また, 後期遺伝子の mRNA が一定時間後に開始することを示唆するものである.

### 3. クロラムフェニコール (CM) による l-RNA 合成開始の阻害

l-RNA 合成の開始にタンパク合成が必要か否かを CM を用いて調べた. CM でタンパク合成を阻害し<sup>35)</sup>, 合成される mRNA が l-RNA を含むか否かを調べた. ファージ感染前 5 分に 50  $\mu$ g/ml の CM を加えた T2 感染 *E. coli* H から 19 分に未標識 RNA を調製した. この条件ではトリクロロ酢酸 (TCA) 不溶性分画への  $^{35}\text{SO}_4^{--}$  の取り込みはみられず, タンパクは合成されていない.  $^{32}\text{P}$ -RNA は前の実験 (図 3) に用いたと同じ 0.5—19 分標識したものをを用い, 競合ハイブリダイゼーションを行なった (図 6). 競合は部分的で CM 存在下では T2 mRNA のうち一部しか合成されないことを示す.

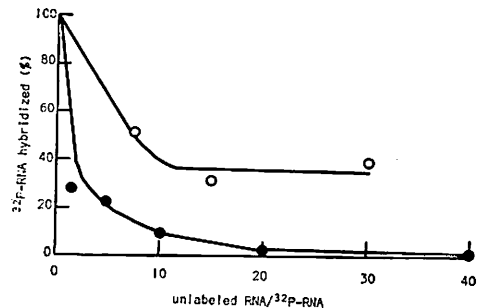


Fig. 6 Hybridization competition between CM-RNA's and normal RNA's. Experiments were performed as described in Fig. 3. (○)  $^{32}\text{P}$ -RNA labeled between 0.5 and 19 min (5300cpm/ $\mu$ g) versus unlabeled CM-RNA which was extracted from T2-infected H cells at 19 min, to which 50  $\mu$ g/ml of CM was added at 5 min prior to infection. (●)  $^{32}\text{P}$ -CM-RNA labeled between 0.5 and 19 min (2960cpm/ $\mu$ g) prepared from T2-infected cells to which 50  $\mu$ g/ml of CM was added at -5 min versus unlabeled 4 min-RNA.

この組み合わせと逆に標識して競合をみた. すなわち  $^{32}\text{P}$ -RNA を上と同じ条件で, CM 存在下で 0.5—19 分標識し, 未標識 RNA は 4 分に調製したものである. 図 6 にみられるように  $^{32}\text{P}$ -RNA は未標識初期 RNA によって完全にハイブリッド分子から排除され, l-RNA は合成されていない. 同じ結果は CM が後期遺伝子の am 変異株 (B17, N91) の FU 回復を阻



害するが、初期遺伝子 am 変異株 (N82) のそれを阻害しないことによっても示される (図 7). これらの結果から、1-RNA 合成の開始

には、それに先行するタンパク合成と考えられる CM に感受性をもつ反応が必要であると結論される。

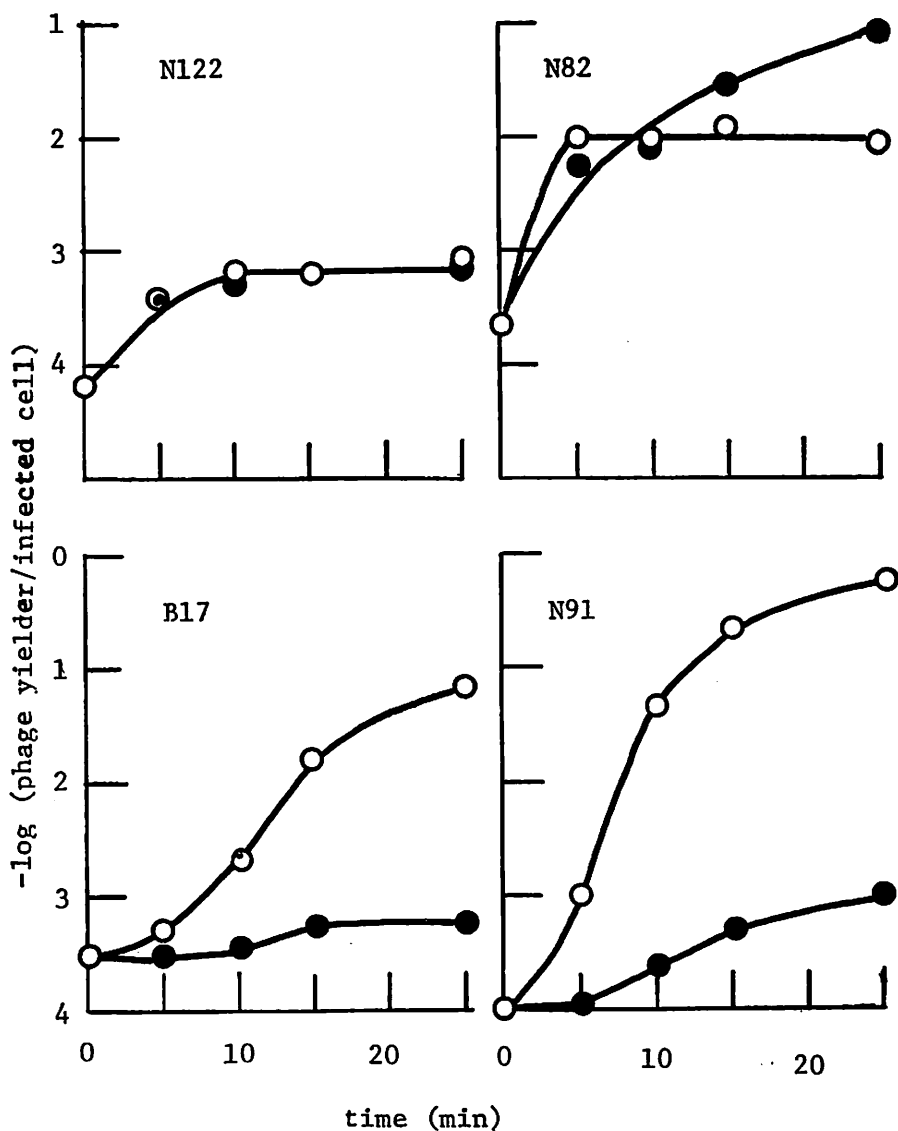


Fig. 7 Effect of CM on phenotypic reversion of T4 amber mutants by FU. Experimental procedure was similar to that described in the legend for Fig. 5, besides that CM ( $25\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was added to one part on infected cell suspension when FU and thymidine was added. (○) no CM was added, and (●) CM was added.

## 4. CMによる eI-RNA 合成停止の阻害

eI-RNA 合成停止に対する CM の効果を知るために次の実験を行なった。ファージ感染後 0.5 分に 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の CM を加え、15—19 分標識した  $^{32}\text{P}$ -RNA と前の実験 (図 4) と同様に調製した未標識 60 分 RNA との間の競合を行なった。図 8 に示すように競合は部分的であり図 4 の結果の初期  $^{32}\text{P}$ -RNA とほぼ同じ様子で、この条件では 15—19 分の間にも eI-RNA 合成が

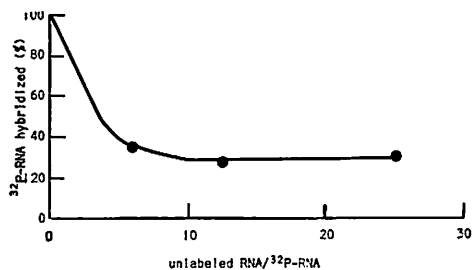


Fig. 8 Inhibition of shut off of eI-RNA synthesis by CM. Experiments were performed as described in Fig. 3.  $^{32}\text{P}$ -RNA labeled 15 and 19 min (13700cpm/ $\mu\text{g}$ ) prepared from T2 infected H cells to which 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of CM was added at 0.5 min versus unlabeled 60 min-RNA (see Fig. 4).

行なわれていることがわかる。eI-RNA 合成の停止にもやはり CM 感受性の反応が必要であると結論される。

## 5. 7-アザトリプトファン (AT) の影響

いままでみた CM 感受性の反応は、タンパク合成と考えられるが、それが単なるタンパク合成反応 (たとえ合成されたタンパクが活性をもたなくても) か、それとも、たとえば後期遺伝子発現のインデューサー、または初期遺伝子発現のリプレッサーのような生物学的活性をもつタンパクの合成であるかを結論することはできない。そこでトリプトファン (try と省略) のアナログである AT の RNA 合成の逐次反応に対する影響を調べた。AT は try のない条件で *E. coli* の try 要求株のタンパク中に取り込まれ、そのタンパクは活性をもたないことが知られている<sup>80)</sup>。

T2 ファージが感染した *E. coli* B *U-arg-try*<sup>-</sup> に対する AT の影響を調べた結果を表 2 にまとめる。細胞はウラシル (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、L-アルギニン (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、L-トリプトファン (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えた TG 培地で増殖させ、遠心で集

Table 2. Effect of 7-azatryptophan on the synthesis of macromolecules in T2 infected *E. coli* B *U-arg-try*<sup>-</sup>

macromolecules	TG medium supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of uracil, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of L-arg and		
	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of L-try	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of L-AT	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of L-AT and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of L-try after 10 min
RNA* <sup>1</sup>	+	+	.....* <sup>2</sup>
protein* <sup>1</sup>	+	+	.....
DNA* <sup>1</sup>	+	-	+* <sup>3</sup>
dCTPase	+	-	.....
lysozyme	+	-	+* <sup>3</sup>
mature phage	+	-	+* <sup>3</sup>

(+) indicates the presence of detectable synthesis and (-) indicates the absence.

\*<sup>1</sup>. Synthesis of RNA, protein and DNA was measured by incorporation of  $^3\text{H}$ -uridine,  $^{35}\text{SO}_4$  or  $^3\text{H}$ -thymidine into TCA insoluble fraction, respectively. For measurement of DNA synthesis 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of deoxyadenosine was added to minimize breakdown of  $^3\text{H}$ -thymidine.

\*<sup>2</sup>. not be measured.

\*<sup>3</sup>. Delayed synthesis (about 10 min) was observed.

菌し, try を含まない新しい培地に懸濁し, 30 分通気して try を除き, ファージ感染前 5 分に AT (20 $\mu$ g/ml) を加えて次の測定をみた。 $^3\text{H}$ -ウリジンのトリクロロ酢酸不溶性分画への取り込みでみた RNA 合成, および  $^{35}\text{SO}_4$  の取り込みでみたタンパク合成は try と AT の場合で同程度進行するが, デオキシシチジントリフォスファターゼ (dCTPase), リゾチームなどの活性をもつ酵素, また活性のある初期酵素によって合成される DNA 合成はまったくみられない。もちろん成熟ファージの産生がないことは明らかである。さらに AT 処理したファージ感染菌に対し 10 分後に try を加えると DNA 合成, リゾチーム合成, ファージ産生の回復が起こる。これらの事実から, T2 感染 *E. coli* try<sup>-</sup> 株で try のかわりに AT の存在下で合成されるタンパクは活性をもたないと考えることは妥当である。

この条件で合成される RNA をまず競合ハ

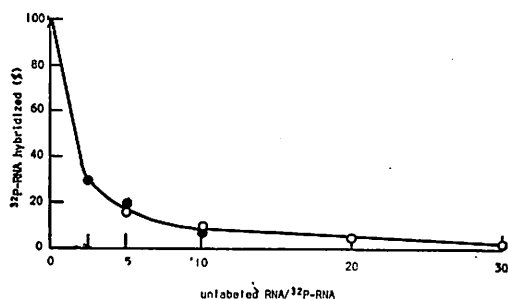


Fig. 9 Hybridization competition between  $^{32}\text{P}$ -AT-RNA and 4min-RNA. Inhibition of late RNA synthesis by 7-azatryptophan (AT).  $^{32}\text{P}$ -AT-RNA was hybridized with DNA in the presence of various amounts of unlabeled 4min-RNA as described in the legends for Fig. 3. Tryptophan auxotrophic mutant cells were grown in medium supplemented with amino acid, collected, suspended in medium supplemented no try, AT (20 $\mu$ g/ml) was added 5min before infection. The culture was labeled with  $^{32}\text{P}$  between 0.5 and 15min (B *U-argt-try*<sup>-</sup>; ●) or between 15 and 19min (H *try*<sup>-</sup>; ○) and RNA was extracted at termination of labeling. Specific activity was 5860 cpm/ $\mu$ g and 4000cpm/ $\mu$ g, respectively.

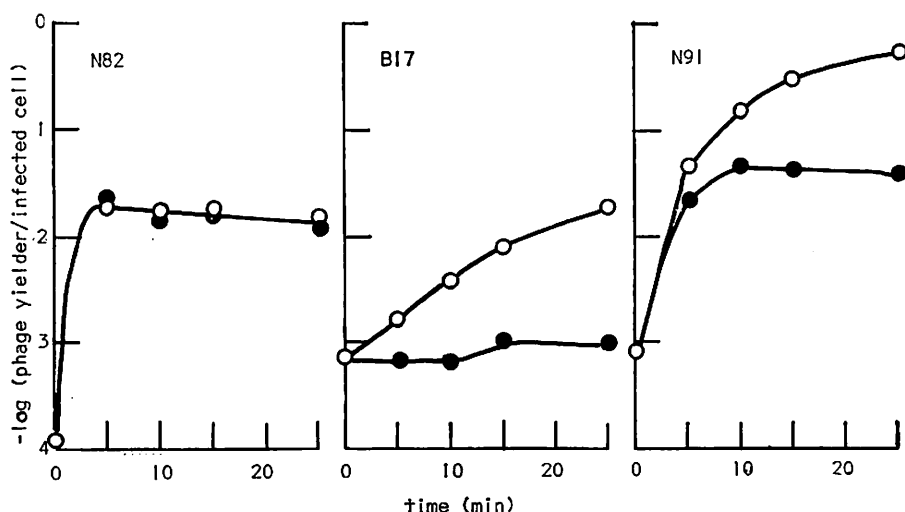


Fig. 10 Effect of AT on the phenotypic reversion of T4 amber mutants by FU. H *try* cells were grown in M9 supplemented with 20 $\mu$ g/ml of DL-tryptophan, collected and washed twice. Washed cells were infected as shown in the legend for Fig. 5 and divided into two aliquots, one was incubated in the presence of 20 $\mu$ g/ml of try+10 $\mu$ g/ml of FU+50 $\mu$ g/ml of thymidine, and another in 20 $\mu$ g/ml of AT instead of try. Samples from incubated cultures were mixed with cells of CR63 in soft agar medium containing 100 $\mu$ g/ml of uracil and 40 $\mu$ g/ml of try after dilution, and poured on hard agar plates. (○) try was added, and (●) AT was added.

イブリダイゼーション法で分析した。ファージ感染後0.5—15分、および15—19分にそれぞれ標識した  $^{32}\text{P}$ -RNA を調製し、4分に調製した未標識初期 RNA と競合を試みた。図9に示すように  $^{32}\text{P}$ -RNA は両者とも完全な競合を受け、初期 RNA 以外の RNA を含まないことが証明された。l-RNA 合成の開始には、活性あるタンパクの合成が必要であるという結論が得られた。この結論は、さらに AT 存在下で *E. coli* H *try*<sup>-</sup> における T4 後期 am(B17, N91) の FU 回復が起こりにくいことによっても支持される (図10)。

同様に eI-RNA 合成の停止に対する影響も試みた。上記と同じ条件で16—20分標識した  $^{32}\text{P}$ -RNA を調製し、40分に調製した未標識 RNA との間で競合を行なった結果を図11に示す。競合は部分的で  $^{32}\text{P}$ -RNA 中に eI-RNA

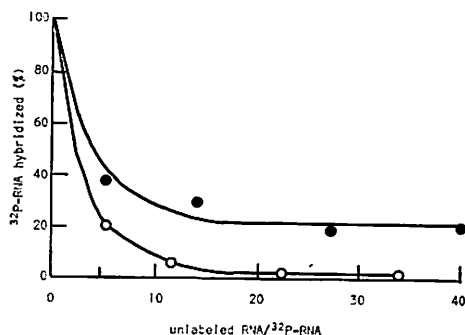


Fig. 11 Hybridization competitions showing inhibition of shut off of eI-RNA synthesis by AT. Experiments were performed as described in Fig. 3. Late unlabeled RNA was prepared at 40min from T4 infected H cells in the same manner as given in the legend for Fig. 4 in the presence of try or AT instead of try. (●)  $^{32}\text{P}$ -AT-RNA (labeled between 15 and 19 min, 4300cpm/ $\mu\text{g}$ ) from T4 infected H *try*-supplemented AT as shown in Fig. 9 versus 40 min *try*-RNA, and (○)  $^{32}\text{P}$ -4min-RNA (labeled 0.5 and 4min, 4800cpm/ $\mu\text{g}$ ) from T4 infected H *try*<sup>-</sup> supplemented 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of try versus unlabeled 40min-AT-RNA.

が含まれ、15分以後も停止せずに合成されている。さらに AT の存在下で40分に調製した RNA がすべての初期 RNA を含むことは、これが初期  $^{32}\text{P}$ -RNA を完全にハイブリッド分子から排除すること (図11) で示される。これらの結果は eI-RNA 合成の停止に寄与するタンパクが存在することを強く示唆する。

## 6. RNA 合成調節機構の進行する時間

l-RNA 合成開始に必要なタンパク合成が進行する時間を知るために CM を感染後 2, 3, 4, 5, 7 分におのおの加え、0.5—15分標識した  $^{32}\text{P}$ -RNA と4分で調製した未標識初期 RNA の間で競合ハイブリダイゼーションを行ない、l-RNA が合成されているか否かを調べた。図12は各  $^{32}\text{P}$ -RNA に対し、20倍および30

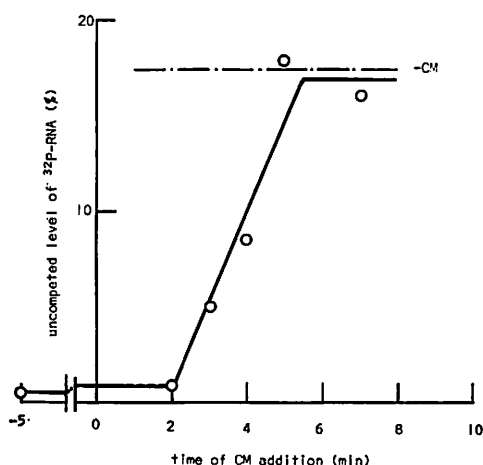


Fig. 12 Effect of time of CM addition on the late RNA synthesis.  $^{32}\text{P}$ -RNA's labeled between 0.5 and 15min were prepared from T2 infected H cells to which 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of CM at -5, 2, 3, 4, 5 and 7min after infection, respectively. Hybridization competition between each  $^{32}\text{P}$ -CM-RNA and excess 4 min-RNA (more than 20 times the amounts of  $^{32}\text{P}$ -RNA), was performed as described in Fig. 3. (○) the average value of uncompleted levels from two experiments in relative to that of input  $^{32}\text{P}$ -RNA plotted against the time of CM addition, and (—) the uncompleted level without CM (see Fig. 3).

倍の未標識 RNA を加えて競合を行ない、排除されずに残るレベルを CM を加えた時間に対してプロットしたものである。2分に CM を加えると l-RNA 合成は起こらないが、5分以後に加えた場合は CM なしの場合と同じレベルに達し、l-RNA 合成は阻害を受けない。T4 後期 am 変異株の FU 回復の際、任意の時間に CM を加え一定時間後に指示菌と混ぜてプレートした結果が図13である。ハイブリダイ

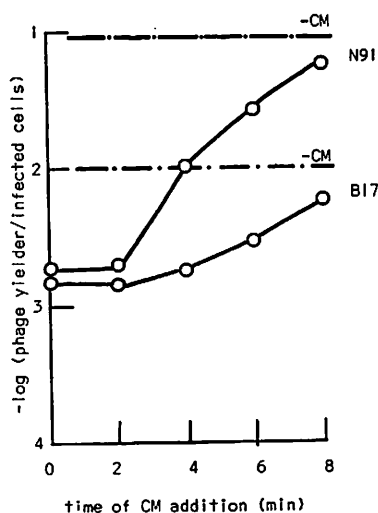


Fig. 13 Effect of time of CM addition on phenotypic reversion of T4 late amber mutants by FU. Washed cells of H, grown in M9AA, were infected in the presence of KCN and unadsorbed phage particles were removed in the presence of anti T4 serum as described in the legend for Fig. 5. Infected cells were divided in six aliquots, and added 10 $\mu$ g/ml of FU and 20 $\mu$ g/ml of thymidine, and incubated at 37°C (time 0). CM (25 $\mu$ g/ml) was added at time 0, 2, 4, 6 and 8 min to separate culture. [At time 15min all culture were sampled, diluted and plated as described in the legend for Fig. 7. Upper lines in the figure indicate rescued particles when CM was not added.

ゼーションの結果と同様、2分以前では CM が回復を阻害するが、4分以後では回復がみられる。l-RNA 合成に必要なタンパク合成は感染後2—4分の間に進行することが結論される。

一方、図14に示したように、5分に CM を加えた場合、eI-RNA 合成は後期まで続き停止反応を阻害する。前に示したように(図4), eI-RNA 合成停止は15分以前に起こるので、停止に必要な条件が成立する時間は5分から15分までの間であることがわかる。しかしこのことから、停止に必要なタンパク合成反応が5分以後に合成される後期タンパクに属するものなのか、または初期タンパクであって停止に必要な量の蓄積に5分以上かかるのかは結論できない。

上の結果をみて、さらに次のことに気がつく。5分に CM を加えた場合、l-RNA 合成反応はもはや阻害されないが(図12), eI-RNA 合成停止の阻害は残っている(図14)。この事実は両反応の調節機構が異なっていることを示

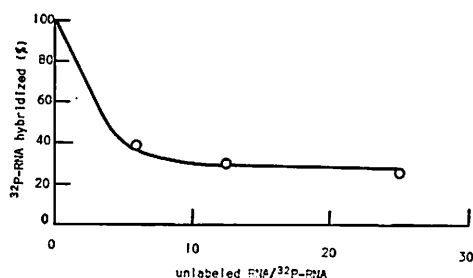


Fig. 14 Hybridization competition between unlabeled 60min-RNA and  $^{32}$ P-CM-RNA that prepared as described in Fig. 8 except that CM was added at 5min (19000cpm/ $\mu$ g). Experiments were performed as described in Fig. 3.

唆するものであろう。少なくとも l-RNA 合成の開始は eI-RNA 合成の停止とは無関係に進行することが結論される。

## 7. CM および AT 存在下で合成される RNA の質的差異

CM および AT 存在下で合成された RNA は、初期 RNA しか含まないことが結論されたが、両 RNA の組成が同一であるとはいえない。前の結果から、AT 存在下ではすべての初期 RNA が合成されていること(図11)、お

よび CM 存在下では初期 RNA 以外のものは合成されていないこと (図 6) がわかる。CM 存在下で合成される未標識 RNA と、 $^{32}\text{P}$  で標識した AT-RNA または初期 RNA との競合は、いずれも部分的であり (図 15 a), CM 存在下では初期 RNA または AT-RNA の一部しか合成されないことを意味する。一方、初期 RNA と AT-RNA の間の競合は  $^{32}\text{P}$  の標識を交換しても、いずれも完全である (図 15 b) ので両者の組成は同じであると考えられる。これらの結果は次の関係式に要約される。

$$\text{CM-RNA} \subset \text{AT-RNA} = \text{初期RNA}$$

## 検

この論文では競合ハイブリダイゼーション法を用いて、まず、T偶数ファージの *E. coli* への感染によって合成される mRNA が3つのグループ、すなわち、eI-, eII-, l-RNA に分けられ、ファージタンパクとの対応が予想されることが示された。eI-RNA および eII-RNA は感染直後に合成が開始され、前者は15分以前に停止するが、後者は溶菌時まで継続する。次に、l-RNA 合成の開始および eI-RNA 合成の停止とタンパク合成との関係を、タンパク合成阻害剤 CM とアミノ酸アナログATを用いて解析し、いずれの反応にも生物学的活性をもつタンパクが必要であることが証明された。さらに、l-RNA 合成開始に必要な反応は2-5分の間に進行し、eI-RNA 合成の停止の条件が成立する時間は5分から15分の間であることが示され、両者を調節する反応が異なることが強く示唆された。これらの結果はT4の初期およ

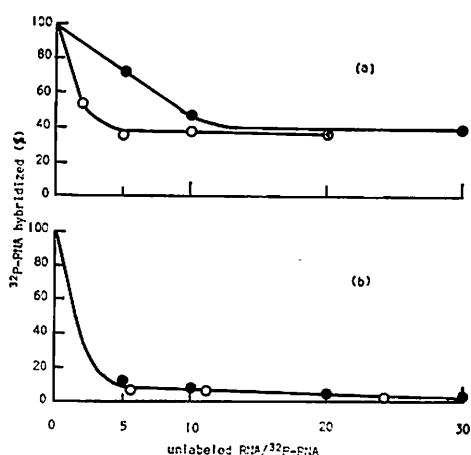


Fig. 15 (a) Hybridization competition between  $^{32}\text{P}$ -4min- or  $^{32}\text{P}$ -AT-RNA's and CM-RNA of T4. Experiment were performed as described in Fig. 3. (○)  $^{32}\text{P}$ -4min-RNA (labeled between 0.5 and 4min, 4800cpm/ $\mu\text{g}$ ) versus CM-RNA prepared at 20min, and (●)  $^{32}\text{P}$ -AT-RNA (labeled between 15 and 19min, 4000cpm/ $\mu\text{g}$ ) versus CM-RNA.

(b) Hybridization competition between 4min-RNA and AT-RNA. (○)  $^{32}\text{P}$ -4min-RNA versus AT-RNA prepared at 20min, and (●)  $^{32}\text{P}$ -AT-RNA (labeled between 15 and 19min, 4000cpm/ $\mu\text{g}$ ) versus 4min-RNA.

## 討

び後期遺伝子の am 変異株の FU 回復による実験でも支持され、l-RNA と後期タンパク、eI-RNA と初期タンパクとの対応を予想させる。これらの結果は2つの反応を支配する調節遺伝子を決定することにより、さらに明確になることであろう。後期遺伝子の発現を支配する調節遺伝子として、 $\lambda$  ファージの Q 遺伝子<sup>17,18)</sup>が報告され、最近 Bolle ら<sup>37)</sup>により T4 の第55遺伝子が後期 RNA 合成開始に必要なことが報告され、T4 ファージに特異的な DNA 依存 RNA ポリメラーゼの存在も報告されているが<sup>38)</sup>、第55遺伝子との関連で検討される必要がある。しかしながら、初期遺伝子発現の停止に関与する調節遺伝子についてはまだ知られていない。

ここに述べられた結果から、すべてではないかもしれないがT偶数ファージの遺伝子発現の調節が転写のレベルで行なわれているらしいと

考えられる。しかし、すべてがそうであるか否かを知ることは重要な問題である。T4 ファージの遺伝子地図<sup>39)</sup>によると、それが必ずしも対応する DNA 部分の物理的な長さに対応するとは言えないが、後期遺伝子の部分が初期に比べて長い。<sup>32</sup>P-RNA の放射性同位元素分布が均一で、RNA 過剰の条件でハイブリッド分子を形成する量が対応する遺伝子の長さに比例すると仮定すれば、4 分までに、60—80% の遺伝子が転写されていることになる。なぜなら 0.5—15 分又は 0.5—19 分の間標識した <sup>32</sup>P-RNA と 4 分に調製した未標識 RNA との競合で、ハイブリッド分子として残る <sup>32</sup>P-RNA が 20—40% になるからである。このことは翻訳のレベルでも調節されていることを予想させるものといえるが、さらに検討の要がある。

つぎに重要なことは、RNA と遺伝子との対応関係を知ることであろう。その目的には T4 ファージの種々の am 変異株を用いて解析すること、遺伝子特異的な mRNA を単離する方法<sup>50)</sup>などが有効であろう。*in vivo* および *in vitro* で遺伝子発現が詳細に研究されつつあるものとしては、他に、λ ファージ、ラクトースオペロンなどの系があり、いずれもリプレッサーが単離され、特異的な DNA に結合することが証明されている<sup>40—43)</sup>。さらに *in vitro* の β-ガラクトシダーゼ合成系<sup>44,45)</sup>、ラクトースオペロン特異的 mRNA 合成系<sup>46)</sup>において、リプレッサーが各々の合成を抑制することも知られている。T 偶数ファージでも *in vitro* で第 55 遺伝子の生産物の作用によって後期 RNA 合成が成功したとの報告<sup>47)</sup>もあるがその機構については明らかでない。現時点では、これらの問題は、DNA 上の RNA 合成開始点(オペレーター又はプロモーター)をめぐるリプレッサー

と DNA 依存 RNA ポリメラーゼの作用という点に集約されてきた。著者は現在、この問題の解明に努力している<sup>51)</sup>。

この報告において、CM 存在下では、初期 RNA の一部しか合成されないが、AT の存在下では全てが合成されることが示された。AT は翻訳を阻害しないが CM は阻害するので、この結果は全ての初期 RNA が合成されるためには、翻訳の進行が必要であることを示すと言えるかもしれない。もしそうなら、この結果は転写と翻訳の共役<sup>48)</sup>の存在を裏づけるものと思われる。しかし、CM は *E. coli* の RCstr 株でアミノ酸除去による RNA 合成の停止を回復させる作用がある<sup>49)</sup>のでさらに検討しなければならない。CM-RNA とこれを除く初期 RNA、および、eI- と eII-RNA との対応関係も興味ある点である。CM-RNA が両 e-RNA を、その全てではないが、含むことは次の事実によって知ることができる。<sup>32</sup>P で標識した CM-RNA と 60 分に調製した未標識 RNA (eI-RNA を含まない) との競合は部分的であるという結果である(図 6)。もし CM-RNA が eI-RNA のみから成っているとこの競合は全くなく、eII-RNA のみなら完全な競合を示すであろう。

稿を終えるにあたり、終始、御指導いただいた京都大学理学部植物学教室芦田諒治教授、皆川貞一助教授をはじめ、助言下さった教室員の各々に深く謝意を表します。また、本稿を作成する際、お骨折りいただいた志村令郎博士にも、感謝します。

なお、本研究を進めるにあたり文部省科研費および Jane Coffine Child Memorial Fund (fo T.Minagawa) の援助を受けた。

## 文

- 1) Adams, M. H.: Bacteriophages, (1959), Interscience, New York.
- 2) Stent, G. C.: Molecular Biology of Bacterial Viruses, (1963), Freeman, San Francisco.

## 献

- 3) Melechen, N. E.: Genetics, 40, 585 (1955).
- 4) Burton, K.: Biochem. J., 81, 473 (1955).
- 5) Tomizawa, J. and Sunagawa, S.: J. Gen. Physiol., 39, 553 (1956).

- 6) Hershey, A. D. and Melechen, N. E. : *Virology*, **3**, 207 (1957).
- 7) Kornberg, A., Zimmerman, S. B., Kornberg, S. R. and Josse, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **46**, 722 (1959).
- 8) Dirksen, M. L., Wiberg, J. S., Koerner, J. F. and Buchanan, J. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **46**, 1425 (1960).
- 9) Delihias, N. : *Virology*, **13**, 242 (1961).
- 10) Wiberg, J. S., Dirksen, M. L., Epstein, R. H., Luria, S. E. and Buchanan, J. M. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 293 (1962).
- 11) De Mars, R. I. : *Virology*, **1**, 83 (1955).
- 12) Koch, G. and Hershey, A. D. : *J. Mol. Biol.*, **1**, 260 (1959).
- 13) Hershey, A. D., Burgi, E., Coccito, C., Ingraham, L., Simon, E. H. and Minagawa, T. : *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **59**, 421 (1960).
- 14) Murakami, W. T., Van Vunakis, H. and Levine, L. : *Virology*, **9**, 624 (1959).
- 15) Minagawa, T. : *Virology*, **13**, 515 (1961).
- 16) Bode, V. C. and Kaiser, A. D. : *Virology*, **25**, 111 (1965).
- 17) Dove, W. F. : *J. Mol. Biol.*, **19**, 187 (1966).
- 18) Damafly, C., Cauturier, M. and Thomas, R. : *J. Mol. Biol.*, **32**, 67 (1968).
- 19) 小田鈎一郎 : 蛋白質核酸酵素, **13**, 613 (1968).
- 20) Hershey, A. D. : *J. Gen. Physiol.*, **37**, 1 (1953).
- 21) Volkin, E. and Astrachan, L. : *Virology*, **2**, 149 (1956).
- 22) Kano-Sueoka, T. and Spiegelman, S. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 1942 (1962).
- 23) Minagawa, T., Okamoto, T., Aono, H., Uchida, A. and Mizuno, N. : *Biochim. Biophys. Acta*, **91**, 158 (1964).
- 24) Hall, B. D., Nygaard, A. P. and Green M. H. : *J. Mol. Biol.*, **9**, 143 (1964).
- 25) Adelberg, E. A., Mandel, M. and Ching Chen : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **18**, 783 (1965).
- 26) Matsukage, A. and Minagawa, T. : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **29**, 39 (1967).
- 27) Marmur, J. : *J. Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961).
- 28) Mandell, J. D. and Hershey, A. D. : *Anal. Biol.*, **3**, 277 (1960).
- 29) Nygaard, A. P. and Hall, B. D. : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **12**, 624 (1959).
- 30) Champe, S. P. and Benzer, S. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 532 (1962).
- 31) Edlin, G. : *J. Mol. Biol.*, **12**, 363 (1965).
- 32) Bose, S. K. and Warren, R. J. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **58**, 2408 (1967).
- 33) Doerman, A. H. : *J. Bacteriol.*, **55**, 257 (1948).
- 34) Stretton, A. O. W., Kaplan, S. and Brenner, S. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31**, 173 (1966).
- 35) Woodruff, B. and Miller, I. M. : *Metabolic Inhibitors*, Vol.2 edited by Hochster, R. M. and Quastel, J. H., Academic Press, New York and London.
- 36) Pardee, A. B. and Prestidge, L. S. : *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 330 (1958).
- 37) Bolle, A., Epstein, R. H., Salser, W. and Geiduschek, E. P. : *J. Mol. Biol.*, **33**, 339 (1968).
- 38) Walter, G., Scifert, W. and Zillig, W. : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **30**, 240 (1968).
- 39) Edgar, R. S. and Wood, W. B. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **55**, 498 (1966).
- 40) Ptashne, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **57**, 309 (1967).
- 41) Ptashne, M. : *Nature*, **214**, 232 (1967).
- 42) Gilbert, W. and Muller-Hill, B. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **58**, 1891 (1966).
- 43) Gilbert, W. and Muller-Hill, B. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **58**, 2415 (1967).
- 44) Zubay, G., Lederman, M. and De Vries, J. K. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **58**, 1669 (1967).
- 45) Fukuda, R. : *Ann. Rep. Cancer Inst. Kana-zawa*, **3**, 14 (1969).
- 46) 大島靖美その他 : 私信.
- 47) Snyder, L. and Geiduschek, E. P. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **59**, 459 (1968).
- 48) Stent, G. S. : *Science*, **144**, 816 (1964).
- 49) Fraenkel, D. G. and Neidhardt, F. C. :



- Biochim. Biophys. Acta, 53, 96 (1961).
- 50) Bautz, E. K. F., Kasai, T., Reilly, E. and  
Bautz, F. A. : Proc. Natl. Acad. Sci., 55,  
1081 (1966).
- 51) Matsukage, A., Murakami, S. and Kame-  
yama, T. : Biochim. Biophys. Acta, 179, 145  
(1969).