

T4ファージを用いた遺伝解析

今回のDNA物語の本文では説明を尽せませんので、興味を持たれる方のために、やや専門的になることを承知の上で付加的な説明を試みました。参考にいただければ幸いです。

シス・トランス テストとシストロン

読者の多くの方は、「シス・トランス テスト」とか「シストロン」と言われても何かおまじないのように思われるかも知れませんが、これはベンザーによって非常に高い精度で行なわれたT4ファージ（以下、T4と略記します）を用いた遺伝解析で得られた方法とそこから導かれた結論なのです。DNA物語の本文中に、T4を用いた解析では、二種類の突然変異株を「同時感染」させた場合に起こる「遺伝的相補」を利用することができるので遺伝解析のスピードが速く、高い精度になると述べました。最初にこのことについて詳しく述べます。

大腸菌の培養液（通常は肉エキスや酵母エキスにナトリウム、カリウム、リン酸などの無機塩を加えた液体培地を用います）にT4を混合するとします。この時、大腸菌の濃度が1ミリリットル（1 ml；別の表現では 1 cc）当たり 10^9 個（10億個）であるとします。もし、希釈後のT4の濃度が1ml当たり数百個であり、その10分の1（0.1 ml）を大腸菌

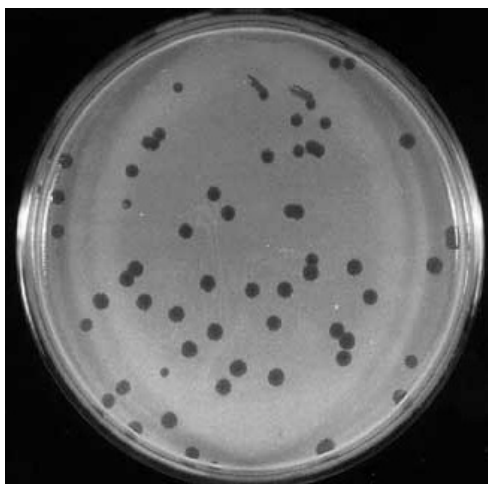


図1：ファージ感染によるプラークの形成

大腸菌にT4ファージを適度に希釈して混合し、混合液を寒天で固めた培地（寒天平板）に広げると、一面の大腸菌の細胞層の上に、T4の感染で大腸菌が溶菌されたプラークが生じます。上の写真はT4の感染によってできたプラークではありませんが、T4の場合も似たようなプラークが観察されます。

と混合したとしますと、図1に示すように寒天平板当たり数十個のプラークが観察されます。

$$Pr = \frac{m^r}{r!} e^{-m}$$

図2：ポアソン分布

多重感染度が m の時、 r 個のファージが大腸菌に感染する確率 Pr は上のポアソン分布の式で与えられます。ここで e は自然対数の底（ネイピア数と呼ばれます）であり、その値は約2.718です。また $r!$ は「 r の階乗」と読み、1から r までの積を表します。

混合するT4の濃度が大腸菌の濃度と同じ場合には、一個の大腸菌の細胞に感染するT4の平均の個数（これを「感染多重度」と呼びます）は1となります。この条件下で、T4に感染していない大腸菌の割合とか、2個以上のT4が感染した大腸菌の割合は、ほぼ「ポアソン分布」（図2）という統計分布になります。図2の式で計算しますと、前者が37%、後者が26%になります。因に、この時ちょうど一個のT4に感染する大腸菌の割合は全く感染を受けない大腸菌の割合と同じで37%になり、三者の割合の合計は当然1になります。もし、感染多重度が2（すなわち、大腸菌の細胞当りのT4の数が2）ですと、これらの値はそれぞれ14%、72%、14%となります。この条件下では、72%の大腸菌が2個以上のT4によって感染を受けることとなります。

次に、上に述べたT4の感染で、二種類のT4の突然変異株を同時感染させる場合を考えます。二種類のT4の突然変異株を1対1（すなわち両者とも同じ濃度）で混合しますと、例えば、多重感染度2の場合には72%の大腸菌が2個以上のT4によって感染を受けることとなりますので、その半分の36%で二種類の突然変異株の混合感染が起ります。もし用いた突然変異が異なる遺伝単位に生じたものであれば、DNA物語の本文の図に示しましたように同

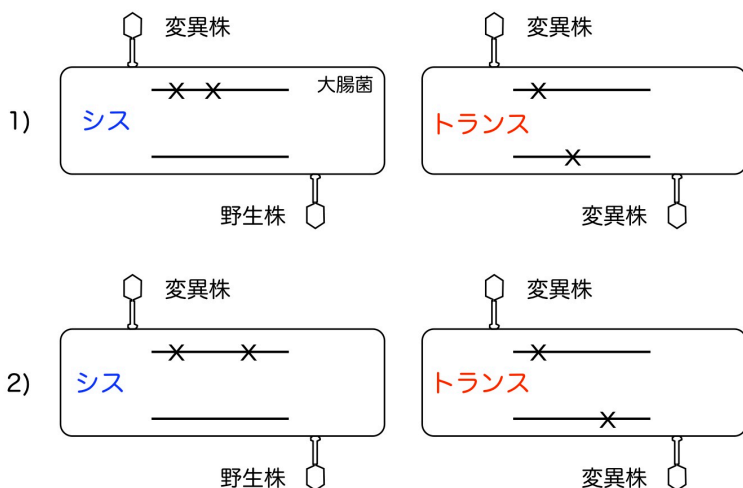


図3：シス・トランス テスト

1) 二つの突然変異（X印）がシスの位置（左）にある場合にはプラークができ、トランスの位置（右）にある場合にはプラークができない場合には、両者は同じ遺伝単位（シストロン）にあると考えます。
 2) これに対して、シスの位置でもトランスの位置でもプラークができる場合には、両者は異なる遺伝単位にあると考えます。通常の同時感染で観察するのはトランスの場合（図の右側）のみであり、したがって、T4の遺伝解析では、プラークができるかできないかを見ることにより、同じ遺伝単位に起った突然変異かどうかを迅速に判定できることになります。

時感染を受けた大腸菌の細胞で「遺伝的相補」が起りますので、感染に用いた大腸菌細胞の36%は溶菌します。もし同時感染を行なっても溶菌が起らないとしますと、それら二株のT4の突然変異は同じ遺伝単位に生じていることが考えられます。これがシス・トランス テストと呼ばれる実験であり、その結果同定される遺伝単位がシストロンなのです。

通常の遺伝解析では、かけ合わせによって子孫を得てそれらの遺伝的形質を調べる必要がありますので、もっとも解析スピードの速い大腸菌の場合でも3日ほどの解析時間が必要です。さらに真核生物としては解析のスピードが比較的速いアカパンカビ（第5回のDNA物語で触れました）の場合でも1週間程度の解析時間が必要です。それに対して、シス・トランス テストによるT4の遺伝解析では一回の感染実験で結果がわかりますので、通常一晩で解析結果が得られます。これは、あらゆる遺伝学の研究材料を対象とした解析方法のうちでもっとも高速な方法です。

T4のrIIという遺伝子領域（rはrapidの略であり、早い増殖を意味します）に突然変異が起ると、T4のもともとの宿主である大腸菌B株では野生型よりも大きなr-プラークと呼ばれるプラークを形成します。しかし、r変異株は大腸菌のK-12(λ)と呼ばれる株ではプラークを作れません。そこでベンザーは、大腸菌B株を宿主として多数のr-変異株を分離し、それらの変異をK-12(λ)を宿主に用いて図3に概略を示したシス・トランステストによって調べました。その結果 rII領域はA・Bと名付けられた二つの遺伝単位（すなわちシストロン）から成り立っていることが見いだされました。

さらにベンザーは、この解析の過程で、通常の突然変異株に生じている「点突然変異」（DNAの一つの塩基が例えばAからGへとか、CからTへというように変化した場合）のほか、隣り合った塩基が同時に脱落して生じた「欠失変異」と呼ばれる変異も多数分離し、それらをいろいろな点突然変異に対するシス・トランス テストで解析し、欠失の範囲を確定しました。そして、範囲のわかった欠失突然変異を利用すると、未知の突然変異の起った場所がより素早く確定できることを見いだしたのです。このようにしてベンザーは2,400株に上る多数のrII突然変異株を分離し解析したのです。

ところで、T4の場合にももちろん子孫の遺伝形質を解析する通常の遺伝解析が可能です。そのためには、同時感染によって得られたプラークの中に含まれている多数の「子フェージ」の中に一定の頻度で生じている、二つの突然変異の間の「遺伝的組換え体」（両方の突然変異を持った株）の出現頻度（遺伝的組換え率）を測定し、それによって両者の突然変異の間の相対的距離を計算します。もし染色体のどの位置でも組換えの起る頻度が同じだと仮定しますと、遺伝的組換え率は二つの変異の間の距離に比例して高くなります。このことを利用した解析から、突然変異の位置を示した遺伝地図ができあがります。T4の場合には多数の変異を高速で解析することができますので、得られた遺伝地図の精度は、個々のDNAの塩基のレベル（理論的に突然変異の起る単位）の1/5程度にまで迫ったのです【現在では、2003年に発表されたT4のゲノム解析結果から、Aシストロンは2,178塩基、Bシストロンは939塩基の大きさであることがわかっています】。

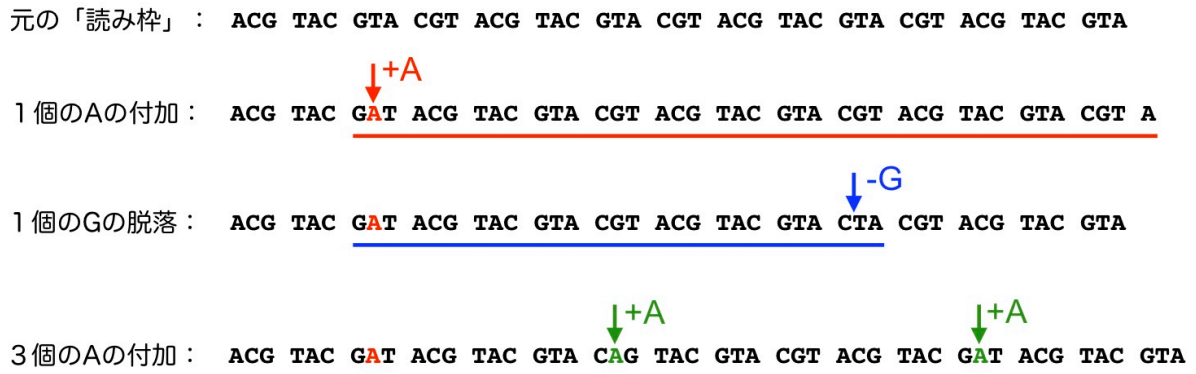


図4：翻訳に際しての「読み枠」の突然変異

r-1589株で機能をもたないAシストロン部分にプロフラビンで変異を誘導し、さらに別の変異を導入して、最初の変異がどのように救済されるかを調べる実験を模式的に示したものです。

プロフラビン等の色素で突然変異を誘導しますとDNAには塩基の付加や欠落が起ります。これは、その結果生ずる「読み枠突然変異」がどのようなものであるかを理解していただくための模式図です。ACGTの繰り返しの塩基配列があり、3個の塩基が一つの単位としてアミノ酸に対応すると仮定した場合（最上段）に、第一段階でAが一個挿入されずと、挿入点以降の読み枠はすべてずれてしまいます（二段目の赤線）。次に青い矢印の点で一個のGが脱落しますと、脱落点以降の読み枠は元に復帰します。同じような復帰は、脱落以外にも、二個のAが付加された場合にも見られることがわかります（最下段）。ただし、いずれの場合も青線部分の読み枠は元と異なっています。

遺伝暗号は何文字か？

ところで、ベンザーが分離して解析した欠失突然変異のひとつに、r-1589と名付けられた突然変異株がありました。遺伝的解析から、この株の欠失変異の生じた場所は、AシストロンのBシストロン側の末端であり、欠失によりAシストロンとBシストロンの境界が失われていること、Aシストロンの機能は失われているもののBシストロンの機能は正常であること、さらに、AシストロンとBシストロンが融合していることがわかりました。

この特殊な突然変異株を利用してクリックらが非常に巧妙な解析を行なったのですが、そのことを説明する前に、まずアクリジン色素という突然変異を引き起こす薬剤の特性について説明しなければなりません。アクリジン色素は、コールタール中から1971年にドイツの科学者によって単離されたものであり、その誘導体は古くから局所的な消毒剤として用いられていました。アクリジン色素の誘導体として、プロフラビンとかアクリジンオレンジという色素がありますが、これらの化合物はDNAの二重鎖の間に入り込み（これをDNAにインターカレートすると言います）、DNAの合成に際しては塩基を一つ（あるいは複数）欠落させたり、あるいは逆に付加したりします。したがって、これらの色素で突然変異を誘起しますと、図4に示すように、塩基の挿入点（あるいは欠落点）以降で

は、mRNAの遺伝情報の翻訳に際して「読み枠」がずれるという現象が起こります。

もし、アクリジン色素を用いて生じた最初の突然変異が二度目の突然変異によって解消されたとします（図4）と、それぞれの突然変異はプラスとマイナスの関係にあることが推測できます。クリックらはこのことを利用してr-1589のAシストロン部分に生じた第一の「読み枠突然変異」が、その後誘起した第二（あるいは第三）の同様な突然変異によってどのように回復するか（あるいはしないか）を丹念に調べたのです。その結果、Aシストロン部分に3個のプラスの変化を導入するとBシストロンの機能が回復することを見だし、このことから彼らは「遺伝暗号は3個でできているのではないか」と推測しました（実際の実験結果とその解釈はもっと複雑なのですが、詳細な説明は省略します）。このことから、それまでは単に統計的な可能性のみで考えられていた一つの遺伝暗号を構成する塩基の数が3であると推測されたのです。

遺伝暗号を構成する塩基の数は、最終的にはニールンバークとレーダーという二人のアメリカの研究者の精力的な実験結果から3個であることが確定し、その結果がまとめられ、どの暗号がどのアミノ酸に対応するかという「遺伝暗号表」として発表されました。これについては、次回のDNA物語で触れます。