

博士論文

Caulobacter crescentus の細胞周期と染色体

氏名 伊庭 英夫

指導教官 岡田 吉美

目次

目次・略語表

i - ii

序章

1~8

第1章

C. crescentus の細胞周期と染色体複製の時期。

9~25

第2章

C. crescentus 染色体の細胞内配位と非対称分裂における分配様式。

26~41

第3章

C. crescentus 細胞の電離放射線照射に対する感受性と標的数。

42~48

第4章

C. crescentus の核様体の単離。

49~65

結語

66~70

謝辞

71

文献

本論文

72

引用文献

73~76

図表及びその説明

77

略語表

AT A	aurintricarboxylic acid
B P B	bromophenol blue
CF U	colony forming unit
C.p.m.	counts per minute
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
mRNA	messenger RNA
NT G	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
PF U	plaque forming unit
RNA	ribonucleic acid
SD S	sodium dodecylsulfate
T C A	trichloroacetic acid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

序章

細胞が機能的・形態的に分化し、新しい形質が発現されて安定化する過程と遺伝情報の発現と制御のレベルで理解しようとする努力が、分子生物学・細胞生物学の進歩と平行して近年積極的に行なわれている。その一つはいうまでもなく高等生物における細胞分裂、発生、分化、老化などの現象を対象としたもので、主として卵細胞・胚や培養細胞の系を用いて行なわれている。しかしその実験系のもつ複雑さは、技術的問題を含めて、早急に明快な解答を得ることを困難にしている。

一方微生物を用いてこの問題の基本的メカニズムを解明しようとする研究も活発に行なわれている。枯草菌の胞子形成過程と遺伝情報の逐次的発現と制御とみる立場から、^{1,2} 生化学的・遺伝学的手法によって解明を試みるなど

は、その一例である。微生物を用いる実験系は一般に、その結果が高等生物のかかえる問題の解決に直接結びつく保証がないという欠点があるが、他方取り扱いが簡便で系が単純なため、複雑な現象の素過程とその複合系と解析するためには極めて優れた実験系であるといえる。

私は、Caulobacter crescentusと呼ばれる一群のグラム陰性菌が、細胞の機能と形態の変化を伴う特徴的な細胞周期を有し、その結果非対称分裂によって増殖するという特徴ある細菌であることに^{3,4}注目し、まだ余り生化学や分子生物学の分野で用いられていないこの細菌と、単細胞における機能的・形態的分化と非対称分裂の新しい実験系として確立しようと考えた。その第一歩として、この特徴的な細胞周期と細胞形態の変化をもたらす Caulobacter crescentus の染色体の構造と機能に、何か通常の細菌とは異なった特徴が見られるのではないかと考え、本研究を開始した。

Caulobacter crescentus は、湖、沼、河川等より単離されるグラム陰性細菌で分類学上は、Pseudomonas に近いとされている。その大きさは $1\sim 2\mu\text{m}$ で、細胞の一極端にストーク (stalk) と呼ばれる突起構造 (図 1, 2) と有し、この特徴が Caulobacter の分類学上の重要な指標の一つとなっている³。

C. crescentus の最適生育温度は 30°C で、栄養培地でも最少グルコース培地でも培養することができ、世代時間はそれぞれ約 100 分、約 180 分である。この細菌の細胞周期は、図 1 に示した如く、異なる形態の細胞が一定時間に一定の順序で現われ、細胞分裂は娘細胞のサイズの上で不等に起り、形態や機能の異なる 2 つの娘細胞を生ずるという独特な経路を辿る。すなわち、細胞分裂の直前には一方の細胞極に一本のべん毛^{3, 5}、数本の線毛⁶、及び DNA リージレセプター部位⁷と有し、他方の極にはストーク³と有するいわゆる前分裂型細胞となる。この前分裂型細胞は非対称的に分裂して、小

型⁸で極べん毛をもつ運動性のスワーマー (swarmer) 細胞と, 大型⁸のストーク (stalked) 細胞との2つの娘細胞になる。

分裂後このスワーマー細胞は伸長の過程でべん毛を培地中に放出し, べん毛の存在した部位にストークを形成してストーク細胞となる。この細胞はやがてストークと反対の極にべん毛を形成して前述の前分裂型細胞へと細胞分化する (スワーマー細胞周期)。

一方非対称分裂の結果生れたストーク細胞は, スワーマー細胞から細胞分化したストーク細胞と形態的に全く同じ過程を経て前分裂型細胞となる (ストーク細胞周期)。このような細胞周期に伴う形態変化は, 直接電子顕微鏡で観察することができる外, 光学顕微鏡下での運動性の観察, DNA ファージ ϕ C6K の吸着性 (DNA ファージレセプターの測定)⁷, RNA ファージの吸着性 (線毛の測定)⁹, べん毛要求性 DNA ファージ ϕ Cp34 の吸着性 (動くべん毛の測定)¹⁰ などによって比較的簡便に定量, 追跡することがで

きる。

このような特徴から, C. crescentus は細胞周期, 非対称分裂, 特異的な細胞機能および形態の発現などを研究する上で有用な系と考えられるが, これらの諸過程の制御にあづかると思われる遺伝子の構造とその発現の調節に関しては, 我々のグループの研究を含めて, 次のような結果が得られている。

転写阻害剤の実験から, C. crescentus の細胞分化の各段階への移行には新たな転写が必要であることが示されており¹¹, またほとんどの mRNA の物質上の¹¹, また機能上の¹²半減期は Escherichia coli の場合と同様短いことも知られている。また連続した細胞周期の中で合成されるタンパク種には, 一定の時期にのみ合成される stage-specific なものがあり^{12,13}, 細胞周期中常に合成されるタンパク種であってもそれぞれ特有な時期に特有な合成速度を示す¹²。多くの場合, ストロー細胞の方がスワーマー細胞より合成活性が高い¹²。これらの結果は,

C. crescentus の遺伝子発現が転写レベルを中心として質的・量的に制御されている可能性の高いことを示している。

転写の特異性を研究するため、DNA依存RNAポリメラーゼの分離、精製が行われ^{14,15}、その鋳型特異性が E. coli のRNAポリメラーゼと部分的に異なることが確かめられているが¹⁵、C. crescentus の細胞周期の中で、異なったRNAポリメラーゼの発現することは知られていない¹⁴。

C. crescentus から DNA フェージ ϕ CbK に耐性な変異株を多数分離し、その表現型を詳しく調べてみると、それらの多くが、DNA フェージ耐性と同時に運動性を失い、また RNA フェージにも耐性となっていることが確かめられた¹⁶。これらの結果は、スワーマー細胞の一端に局在するべん毛、線毛および DNA フェージレセプターの形成が同一因子によって pleiotropic に制御されていることを示している。また温度感受性変異株を用いた実験により、そのような局部構造の形成が mRNA の生成段階で同時に制

御されていることが示唆されている¹⁷。しかしこれらの局部構造と欠損した変異株も野生株とほぼ同じ世代時間で増殖し、かつ不等分裂を行なうから¹⁸、これらの構造体は細胞周期に依存した形成を行なうが、細胞周期を制御する因子とはなっていない。

そこで私は、非対称分裂を行ない、生じた2つの娘細胞に異なる細胞周期をたどらせる C. crescentus の特徴的な過程と、染色体の何らかの特徴的な構造あるいは機能発現にあるのではないかと考え、DNAの娘細胞への分配のされ方をも含めて、細胞周期と染色体の相関々係を明らかにしようとした。

まず各娘細胞が細胞周期中のどの時期に染色体の複製をおこなうのか、この間細胞内の染色体の配位にどのような変化が生じるのかといった基本問題を解明した(第1章)。次にDNA鎖のレベルで染色体がどのような運命をたどって娘、孫細胞へと分配されるのかを決定した(第2章)。この結果、C. crescentus

の娘細胞が2箇の遺伝子コピーを持つ事が示されたのでその生物学的な意義を追求するために放射線生物学的手法を適用した(第3章)。さらに第4章では細胞内から実際に核様体(Folded chromosome)を単離し、細胞周期中における染色体の複製、転写等の機能との関連について調べた。

第1章 C. crescentus の細胞周期と染色体複製の時期。

1-1 序論

前核細胞においては、¹⁹⁻²⁵ Escherichia coli, Bacillus subtilis^{26,27} 等での研究から、細胞分裂の周期と染色体の複製周期との間に密接な関係があることが示されており、細菌の増殖速度等の変化に即応して娘細胞への遺伝子分配が確実におこなわれるように制御されている。しかし、染色体複製の完了と細胞分裂が E. coli では共役しているが、²² B. subtilis では共役していない²⁷ という実験結果から、その共役と制御の機構は、それぞれの細菌によって異なると考えられる。

特に Caulobacter crescentus の場合、非対称分裂という極めて特異な細胞分裂を含んだ細

胞周期と有することから，2娘細胞が等量のDNA分配と受けるのか否かという基本的な問題を含め，細胞分裂の周期と染色体複製の周期の関連を知ることが重要である。

そこで本章では，栄養培地中において速い増殖速度で分裂している C. crescentus CB13株が2つの娘細胞のそれぞれの細胞周期中のどの時期に染色体複製をするのかを決定し，さらに単位細胞当りのDNA量をスワーマー細胞とストック細胞とで比較した。また，最少培地中で遅い増殖速度で分裂している場合についても検討し，C. crescentus CB15株で報告されている結果²⁸とも比較して Caulobacter crescentus の細胞周期における染色体複製の時期を明らかにした。本章の成績は主として本論文1で発表した。

1-2 材料と方法

菌株

C. crescentus CB13株野生株, 及び C. crescentus CB13 tdr-806 B35 R4株を使用した。CB13 tdr-806 B35 R4株は, CB13株を3回NTG処理して得た低濃度チミジン要求株であるCB13 tdr-806 B35の自然復帰変異株の一つで, 野生株と異なって最少培地中でも安定した増殖を行なう。

培地及び培養条件

栄養培地としてPYE培地³を使用した。PYE培地は1ℓの中にポリペプトン2g, 酵母エキス1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.35gを含む。

最少培地としてHMG培地(M3培地³に同じ)を使用した。この培地1ℓ中には, NH_4Cl 0.5g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 4.43g, KH_2PO_4 1.06g, グリコース2g, $CaCl_2$ 0.05g, Hutner Minimal Base 10ml, を含んでいる。C. crescentusは30℃において振盪培養した。

生菌数測定

生菌数測定は重層寒天プレート法（上層寒天0.5%）で測定し，通常3枚以上のプレートの平均値から求めた。

細胞数測定

培養液中の細胞濃度が約 2×10^8 細胞/ml 以下になるように適当な希釈をおこなった後，2%ホルムアルデヒドで固定し氷冷する。この標品を菌数計算板上で位相差顕微鏡（Nikon S-ke型）下600倍の倍率で計測する。1標品につき500細胞以上を計測し，菌数濃度を算出した。

同調培養法

スワーマー細胞を80%程度含んだ C. crescentus CB13の培養液を比較的大量（約 6×10^9 細胞以上）に得る方法として，我々の開発した減速期法⁹（retardation phase method）を用いた。この方法はpYE培地中で増殖した場合減速期においてスワーマー細胞が自然に蓄積してくる現

象と利用したものである。

PYE培地中で増殖している C. crescentus CB13 培養液から選択的にスワーマー細胞だけを分別するためには、プレート選別法²⁸ を使用した。この方法は、ストック細胞をストック先端部位でガラスプレートの底面に吸着させた状態で増殖させ、短時間の培養中に培養液中に産生、放出されるスワーマー細胞を回収する方法である。この方法により95%以上がスワーマー細胞であるような培養液($1 \sim 3 \times 10^7$ 細胞/ml)が約3ml得られる。

HMG培地中で増殖している C. crescentus CB13 tdr-806B35R4株から選択的にスワーマー細胞を得るにもプレート選別法^{28, 12} を使用した。ただしこの培養条件下では細胞のガラスへの吸着力が不十分なので、ガラスプレートとあらかじめ0.002%ポリ-L-リジン(MILES-YEDA社)水溶液で処理しておくことが必須であり、この改良法¹² により95%以上がスワーマー細胞である培養液(約 1×10^7 cell/ml), 約3mlを得る

ことができる。

DNA量の定量

C. crescentus CB 13 の培養液を低速遠心で集菌し、50mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂ (pH 7.8) を含む緩衝溶液で洗じよう後、これから DNA を Schneider 法²⁹ を一部改変した方法により抽出し、アルカリ分解法により混在する RNA を除去した。DNA量は Burton の改良法³⁰ によるジフェニルアミン法で定量した。標準 DNA として仔牛胸腺 DNA を使用した。

DNAの放射能標識

DNA は [G-³H] デオキシアデノシン (17 Ci/ml England Nuclear 社) で標識 (23~167 μ Ci/ml) した。標識した培養液に TCA を添加して最終濃度 10% とした後 0°C で冷却し、その不溶画分を低速遠心で回収した。この不溶画分はアルカリ分解により RNA 画分を除去した後、再び冷 10% TCA 中で不溶化し、その放射活性から DNA

への放射能の取り込みを定量した。

1-3 結果

ストック細胞周期における DNA 合成時期。

(栄養培地)

ストック細胞周期における DNA 合成時期を測定するために、以下に示すパルス-チェイス実験をおこなった。まずガラスプレート上に吸着して PYE 培地中で増殖しているストックと有する細胞に対し ^3H -デオキシアデノシンで 10 分間パルスラベルをおこない、その後ガラスプレートと非放射活性のデオキシアデノシンを含む新鮮な PYE 培地で洗ってチェイスをおこなう。その後 8 分おきに培養液中に放出されてくるスワーマー細胞を静かにつぎうっして回収し、そのたびに前述の培地を補充する。経時的に回収されるスワーマー細胞の生菌数及び DNA 中に取り込まれた ^3H の放射活性をそれぞれ測定する (図 3)。

図3に示された如く、ガラス面に吸着しているストーク細胞はほぼ一定速度でスワーマー細胞を産生しており、スワーマー細胞内のDNA中に取り込まれた放射活性は、この細胞を産生した細胞がパルスラベルされた時のDNA合成速度を直接反映していると考えられる。従って最初の35分間に放出されてきたスワーマー細胞にほとんど放射活性がないことから、分裂直前から35分間程DNA合成のほとんどない時期(G_2 期)が存在することが推察される。これ以後に放出されてくるスワーマー細胞には約50分に渡って高い放射活性が検出され、この時期が染色体の複製時期(S期)であることがわかる。ストーク細胞の世代時間は約85分³であることから、S期はほぼ分裂直後のストーク細胞から開始していることになる。この一世代時間の後には再び2世代目の G_2 期に由来する谷と、それに引き続くS期のピークが観察されるが、その高さは半減した。後の2章で示されるように、この結果は

非対称分裂によっても DNA が等量ずつ娘細胞に分配されていることを示している。ストック細胞周期はモデル的に図 6 の如くなる。

スワーマー細胞周期における DNA 合成時期

(栄養培地)

まずスワーマー細胞をプレート選別法で得てこれを 30°C で PYE 培地中で振盪培養をおこない同調培養を開始する。時々この培養液から一部をとり、 ^3H -デオキシアデノシンで 8 分間のパルスラベルを行ない DNA への放射活性の取り込みを定量した (図 4)。同時に行なった生菌数測定から、同調的な増殖をしていることが確認される (図 4)。パルスラベルの結果からわかるとおり、同調培養開始後 30 分間はほとんど DNA 合成が見られない (G₁ 期)。

この G₁ 期の時間はスワーマー細胞がストック細胞へと細胞分化していく過程に相当しており、この過程には染色体複製が伴っていないことがわかる。その後 DNA 合成を示す高い

放射活性がDNA分画中に見い出され、約50分間に渡って一定した取り込みが持続され、染色体の複製がおこなわれていることを示している（S期）。放射活性はその後約35分間ほど谷を形成し（G₂期）、再び増加する。以上の結果から、スワーマー細胞周期にもストーク細胞周期とほぼ同じ長さのS期とG₂期があるが、その他に複製の開始前にG₁期があることがわかる。スワーマー細胞周期はモデル的に図6の如くなる。

染色体複製の完了と細胞分裂（栄養増殖）

E. coli B/r²² や C. crescentus CB15^{3/} では染色体の複製完了と細胞分裂が共役されていることが示されており、DNAの複製完了と細胞分裂の間の時間を求めるのに利用されている。そこでこの方法を用いて C. crescentus CB13 の G₂ 期の時間の長さの決定をおこなった。

PYE培地中で対数増殖している C. crescentus CB13 に対し、ハイドロキシウレアを最終濃度

4mg/ml で添加する。この濃度のハイドロキシウレアはDNA合成を7分以内に完全に阻害する(図5)。一方細胞数は添加後もそのまま連続して指数関数的に増加するが, 37分後に分裂を停止し細胞数はその後一定に保たれる(図5)。このことからpYE培地中で増殖している C. crescentus CB13 においてもその染色体複製の完了と細胞分裂が共役しており, 両者の時間差から G_2 期は約30分と計算された。この結果は上述のパルス-ラベル法, パルス-チェイス法により求めた G_2 期の長さとのよい一致を示す。

単位細胞当りのDNA含量

上述の結果からスワーマー細胞とストック細胞は同量のDNAを細胞内に持っていることが推定されるが, これを確認するために, この両細胞の単位細胞当りのDNA含量を定量した。スワーマー細胞は減速期法により調製した。ストック細胞は, 減速期法で得たスワー

マーマー細胞を10倍容の新鮮なPYE培地中に希釈後30分間振盪培養することにより調製した。培養液から生菌数及び細胞数測定のために一部をとると同時に、残りの培養液に25mM NaN₃を添加し氷冷後集菌して、1-2に述べた方法によりDNAを抽出定量した。

表1にスワーマーマー細胞とストック細胞の単位細胞当りのDNA含量を示す。両者はほぼ同一の値を示し、スワーマーマー細胞からストック細胞への移行の間に染色体の複製が開始したことが裏づけられた。E. coli 染色体は1つあたり $4.67 \times 10^{-9} \mu\text{g}$ のDNA量をもつことが報告されている³²。従ってここに得られた C. crescentus の単位娘細胞当りのDNA含量 ($\sim 1 \times 10^{-8} \mu\text{g}$) は、E. coli の2ゲノム当量に相当していることがわかる。C. crescentus DNAのgenetic complexityは、E. coli のそれとほぼ同じであるという報告³³を考えあわせると、C. crescentus の娘細胞は細胞当たり2箇のゲノムを持っていることとなる。この点に関しては第2章で改めて詳述する。

遅い増殖速度における染色体複製の時期

上述のように、栄養培地中で速い速度で分裂する C. crescentus CB13 についてその DNA 合成の活性測定からスワーマー細胞周期は、 G_1 , S , G_2 期から成っており、一方ストック細胞周期は S , G_2 期から成っていることが示された(図 6)。このような DNA 合成活性からみた細胞周期の基本的な過程は、増殖速度がより遅い場合にも保たれるのであろうか。この問題を解決するために最少培地中で安定して増殖することのできる C. crescentus CB13 由来の変異株 CB13 tdr-806 B35R4 を用いて前述と全く同じ方法で DNA 合成時期を測定した。

ストック細胞周期は DNA のパルスチェイス法による標識により、40 分の G_2 期と 100 分の S 期からなっていることが図 3 と同様の実験で示された。またスワーマー細胞周期は DNA のパルス-ラベル法による標識により 60 分の G_1 期、100 分の S 期及び 40 分の G_2 期からなっていることが図 4 と同様の実験から明らかにされた。

G₁期に相当する60分間というのは、この増殖過程においてスワーマー細胞がストック細胞へと分化する時期にほぼ一致していることから、C. crescentusは増殖速度の速い栄養培地においても増殖速度のおそい合成培地においても細胞周期と染色体複製の相関々係から見た場合に、本質的に同じであることが確かめられた。

1-4 考察

本章では2種の増殖速度においてC. crescentus CB13株及びその変異株の細胞周期中における染色体複製時期と決定した。これらの結果を最少培地中で増殖しているC. crescentus CB15株について報告されている結果とあわせて、表2に総括した。

この結果、使用した菌株や増殖速度によらずスワーマー細胞周期はG₁, S, G₂期から成り、ストック細胞周期はS, G₂期からなっているこ

とが明らかである。G₁期は、ちょうどスワーマー細胞がストック細胞へと細胞分化するのに必要な時間に相当し、この過程にDNA合成は必要でないことを示している。

これらの結果から、C. crescentus の非対称分裂について次の2つの重要な事実が判明した。一つは、2つの娘細胞の間にはDNA合成の開始能に関して決定的な差異のあることである。すなわち分裂直後のストック細胞はただちに染色体の複製過程に入ることができるが、スワーマー細胞では、複製開始の準備が完了していないか、何らかの制御機構が働いて複製開始が抑制されていると考えられる。他の一つは、両娘細胞はDNAを等量ずつ有している点である。すなわち非対称分裂に際して遺伝子は等量ずつ分配されるのである。

第一の点に関連して、C. crescentus の増殖速度の変化に伴うG₁, S, G₂ 各期の変化をまとめた表2の結果を、E. coli の場合と比較すると、その特徴はより明確となる。E. coli B/rでは、

DNAの複製の終了から細胞分裂までに要する時間(D値)及び複製点が生ゲノムを移動するのに要する時間(C値)が種々の増殖速度で系統的に調べられており^{20,24}, この2つの値は世代時間1時間内では比較的一定で, それぞれ20分, 40分であるとされている。C. crescentus CB13では, このD値に相当するG₂期の長さは35~40分とE. coliと同様, 増殖速度にほとんど影響を受けず, ほぼ一定している。一方, E. coliのC値に相当するC. crescentusのS期の長さは, 栄養培地であるPYE培地中では約50分とE. coli B/rに近い値を示すが, HMG培地中では100分と倍化し, 最少培地のように増殖速度が低下した場合は, 複製の進行速度自身もそれに見合って低下していることがわかる。

またC. crescentusのスワーマー細胞に特異的なG₁期の長さも増殖速度がおそくなるとそれに伴って長くなる。DNAの複製開始と準備するG₁期と, DNAの複製の進行速度に比例するS期がどのような機構によって増殖速度との関

連の下に調節されているのか、これは今後に残された未解決の問題である。

E. coliでは、C値、D値が増殖速度にかかわらず一定であるため、ある程度以上に増殖が速くなると、DNAの複製はその分子の複製が完了しないうちに次のサイクルの複製がスタートし、その結果いわゆる multi-fork 型の多岐的複製を行なうことになる^{20,26}。しかし C. crescentus においては増殖速度にかかわらず、染色体複製が行なわれない G₁期・G₂期が常に存在しており多岐的複製はおこなわれない。

第2章 C. crescentus 染色体の細胞内配位と非対称分裂における染色体の分配様式

2-1 序論

前章では、C. crescentus の細胞周期と染色体の複製の相関関係について調べ、スワーマー細胞とストーク細胞では染色体複製の開始の時期が異なり、それがそれぞれの細胞周期における形態変化の過程と深く関連していることを示した。序章で触れたとおり、これら2つの細胞の遺伝子発現に関しては質的にも量的にも異なることが報告されている。また、DNAの定量結果から示唆されたように、C. crescentus は細胞当たり2箇のゲノムを持っている可能性がある。従ってまず染色体に注目し、その特徴づけを行うことに焦点を絞った。

すでに Osley と Newton は, C. crescentus の染色体分配について「1 染色体」説と提出している³⁴。しかし第1章で述べた DNA 含量の定量結果は, もし C. crescentus の娘細胞が1 染色体をもつのであれば, その DNA の分子量は E. coli の約2倍であることを示すことになり, C. crescentus DNA の kinetic complexity は, E. coli の³³それにほぼ等しいという CoT 分析の報告と矛盾する。最も考えやすいのは C. crescentus の娘細胞が細胞当り2箇の染色体を含むというモデルである。

本章では, まず染色体がいくつあるか, そしてそれは細胞内でどのように位置しているかと直接観察することから始めた。その結果予想された如く C. crescentus の2箇の娘細胞はいづれも2箇の染色体を有し, かつそれらの分離 (segregation) の程度に差のあることが見出された。またこの2つの染色体の相互の関係を知るために, DNA鎖のレベルで染色体がどのように娘・孫細胞へと分配されるかを決定

し、2箇の染色体が互いにゲノムとして同一であることを示した。本章の結果は、本論文1及び3で発表した。

2-2 材料と方法

菌株及び同調培養条件

C. crescentus CB13野生株を核染色及びケイ光染色観察の材料とした。 ^3H チミジンによるDNA標識にはHMG培地中で増殖するCB13 Idr 806 B35 R4 及びCB15野生株を使用した。同調培養はすべてプレート選別法を使用した(1-2参照)。

核染色法

細胞培養液に25mM NaN_3 を添加した後にこれをスライドグラス上に滴下し室温で風乾する。オスミウム酸の蒸気に2分間さらして固定をおこない ³⁵piechaud³⁵ の方法に準拠して染色した。染色液は使用直前にエオシン・ブルー水

溶液 ($0.2 \sim 0.3 \text{ mg/ml}$) と 0.2 ml のギムザ染色液とを混合して調製し、染色時間は8分間とした。観察は光学顕微鏡下 (Nikon S-k₂型) で1500倍の倍率でおこなった。

染色体のケイ光染色法

C. crescentus CB13の種々の細胞型と、約 0.04 ml 分取し、直接スライドグラス上に滴下する。ほぼこれと同容のエチジウムブロマイド水溶液 ($50 \sim 100 \mu\text{g/ml}$) をこの上に滴下し、ただちにカバーグラスをかぶせよく混合する。万能生物顕微鏡 (オリンパス VANOX) の光学系と位相差顕微鏡用にあわせ、細胞形態を確認した後、200W 超高圧水銀灯を光源として落射型蛍光顕微鏡の光学系 (AH-RFL) を使用して蛍光を観察する (倍率はすべて1500倍)。通常、エチジウムブロマイド混合後30秒～1分以内にケイ光観察が可能となり、10分以内に写真撮影を完了させた。上記のケイ光染色法は Hecht³⁶ らの方法に準拠したものであり、

基礎生物学研究所, 黒岩常祥先生に御指導いた
だいて観察した。

DNA の一方の鎖のみを標識したスワーマー細胞の調製

1-2 で述べた方法に従ってスワーマー細胞
を HMG 培地中に産生放出しているガラスプレ
ート培養液を調製する。この時ガラスに吸着
している細胞が対数増殖をするように30分お
きに培地を交換する。このプレート培養液に
[メチル- ^3H]チミジンと $500 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の濃度で添加
し使用した菌株の S 期に相当する時間 (CB13
tdr 806 B35 R4・100分, CB15・90分²⁸) だけ標識す
る。その後培養液を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の非放射性チミジ
ンを含む HMG 培地で数回洗い, この培地中で
さらに G₂ 期に相当する時間 (CB13 tdr 806 B35
R4・40分, CB15・30分) ティイスを行なう。再
びこのガラスプレート培養液を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の非放
射性チミジンを含む HMG 培地で数回洗って,
次の20分間中に培地中に放出されてくるスワ

ーマー細胞をデカンティションにより回収し以下の実験に使用する。

このようにして得られたスワーマー細胞は前回の染色体複製時にのみ標識されているので、おのこのDNA分子中1本の鎖のみが放射標識されているはずである。

DNAを標識された細胞のオートラジオグラム

細胞培養液をスライドグラス上に滴下して室温で風乾した後、これを1.5% (w/v) のクロム酸で固定しさらに蒸留水で酸を洗い流した。風乾した後、スライドグラスを45°Cに保温したサクラエマルジョンフィルムNR-M2中に2秒間浸した後自然乾燥する。フィルムはデシケータ中で4°Cにおいて露光させる。現像した後、オートラジオグラムは1500倍で位相差顕微鏡(Nikon SKE型)下で観察し計測した。

試薬類

エオシン・ブルー、ギムザ染色液はMerk社から

購入し, [メチル- ^3H] チミジン (50 Ci/mmol) は New England Nuclear 社から購入した。

2-3 結果

核染色法による染色体観察

C. crescentus CB13 野生株を PYE 培地中で同調培養し, 培養開始後 0 分, 30 分, 85 分の培養液からそれぞれスワーマー細胞, ストロー細胞, 前分裂型細胞を得た。これらの細胞を核染色して得た光学顕微鏡写真を図 7 に示す。

ほとんどのスワーマー細胞は近接した 2 箇の染色体を持っており (図 7 A), 一方ストロー細胞は約 $0.4\mu\text{m}$ 以上分離 (segregate) した 2 箇の染色体を有している (図 7 B)。それに対して前分裂型細胞では細胞の中央部のくびれをはさんで一方では近接した 2 染色体が, 他方でははっきりと分離した 2 染色体が存在し計 4 箇が観察される (図 7 C)。

このような多核の細胞が観察されるのは,

増殖速度が速い PYE 培地を用いた場合のみでなく、HMG 培地を用いて増殖させた場合（世代時間 4~5 時間）にも観察され、対数増殖期の細胞はほとんど 2~4 箇の染色体を有している（図 7d）。それぞれ 200 箇の細胞について計測した結果を図 8 にまとめて示した。

各細胞型の核染色写真からスワーマー細胞、ストック細胞、前分裂型細胞の細胞長を測定したところそれぞれ $1.13 \pm 0.10 \mu\text{m}$, $1.52 \pm 0.11 \mu\text{m}$, $2.32 \pm 0.29 \mu\text{m}$ であった。このことからスワーマー細胞がストック細胞へと分化する時に約 $0.4 \mu\text{m}$ の伸長をすると考えられる。またストック細胞中の 2 箇の染色体は互いに $0.4 \mu\text{m}$ 以上分離していることから、細胞の伸長は 2 染色体の間でおこっていることが推定される。

ケイ光染色法による染色体観察

C. crescentus CB13 野生株を PYE 培地中で同調培養し、培養開始後 0 分、65 分、85 分の培養液

からそれぞれスワーマー細胞，伸長ストーク細胞（S期の中～後期に相当している。），前分裂型細胞を得た。おののおのエチジウムブロマイドに浸してDNAを染色した後，直接蛍光顕微鏡下で染色体を観察した（図9A, B, C）。

その結果スワーマー細胞の染色体はかなり近接した2つの球として観察され（図9A），S期にある細胞では染色体は完全に2つに分離しているのみならず，おののおのの染色体は細胞軸の方向に偏長となっているのが観察される（図9B）。複製をおえた前分裂型細胞では（図9C）4箇の球状の染色体が区別できる。以上の観察から細胞を固定せずに直接ケイ光染色した場合にも本質的に核染色と同一の結果が得られた。従ってDNA含量の結果とあわせて，Caulobacter crescentusには娘細胞当たり2箇の染色体が存在していることが明らかになった。

娘細胞中の2つの染色体の実体と、分裂における分配様式。

Woodらによる *C. crescentus* DNA の Cot 分析³³の結果によると、*C. crescentus* の kinetic complexity は *E. coli* のそれに等しいかやや小さいとされている。従って核染色で観察される娘細胞中の2箇の染色体は同一の2箇のゲノムに相当すると推定される。そこでこれを実証するために、DNA鎖のレベルで染色体が娘・孫細胞へとどのように分配されていくのかと決定し、細胞内の保存単位 (conserved unit) の数を求めようと考えた。

まず2-2に述べた方法に従って、DNA鎖の一方の鎖のみを[メチル-³H]チミジンで標識したスワーマー細胞を調製した。これを非放射性の培地中で2世代に渡って同調的に培養した。ラベルされたDNA鎖の運命を調べるために、時々その一部を取り出しそれを2-2に述べた方法によりオートラジオグラムにかけた。この同調培養液の生菌数測定と10%TCA

不溶画分の放射活性と同時に定量して (CB13 tdr 806 B35R4, 図11a ; CB15株, 図11b) 同調的に分裂が進行していることと, [メチル- ^3H] チミジンが効果的にチェイスされていることを確認した。

CB13 tdr 806 B35R4 株を使用して得られたオートラジオグラムの結果を図10に示した。この図は単位細胞当りのグレイン数 (n) をポアソン分布と比較しやすい形³⁷にかえて示してある。すなわちこのグラフでは, 完全なポアソン分布をしている場合には直線で表現されることになり, その直線の傾きから単位細胞当りのグレイン数 (\bar{n}) が算定される。

実験に用いたスワーマー細胞の単位細胞当りのグレイン数はポアソン分布に従うことが示された (図10, 0分)。これはすべてのスワーマー細胞が期待通り前回のS期において均等に放射標識されていることを示している。最初の同調的な細胞分裂が終了した後においても (240分) グレイン数はほぼポアソン分

布を示しているが平均グレイン数は半減している。第2回および第3回目の同調的な細胞分裂の終了時(360分および420分)には、ポアソン分布より期待される直線からはずれる細胞群がグレイン数0の細胞中にあらわれ非標識細胞がそれぞれ全体の約1/2、及び約1/2存在することが計算される。上述とほとんど同一の結果はCB15野生株を使用した実験でも得ることができ(データは示していない)。

以上の様にして算定した標識細胞の存在率及び標識細胞当りの平均グレイン数(\bar{n})を図11(CB13 tdr806B35R4)及び図12(CB15野生株)に要約して示した。この結果使用した菌株にかかわらず、標識細胞当りの平均グレイン数は第1回目の同調的な分裂の後には半減するが、その後の分裂では一定に保たれている(図11, 図12)ことが明らかになった。このことはそれぞれのスワーマー細胞中に存在した標識されたDNA鎖が2保存単位(*conserved unit*)から成っていることを示している。

この結果から私は「娘細胞は2ゲノムを有し、この遺伝的に同一な2箇の染色体は複製後それぞれ次代のスワーマー細胞とストック細胞とに分配される。」というモデルを提出した。このモデルから期待される理論曲線と図11及び図12の(b)と(c)に実線で示したが、実測値とよく一致した。このモデルは先に述べた核染色の観察結果や、第1章で求めた単位細胞当りのDNA含量の定量結果ともよく合致するものである。

考察の節で詳述するが Osley と Newton は、これに反して「遺伝子は、1染色体単位(single chromosomal unit)で分配されていく」というモデルを提出している³⁴。このモデルから期待される理論曲線と図11と図12にそれぞれ破線で示したが、実測値と大きくかけはなれており、このモデルで C. crescentus の分裂に伴う遺伝子の分配様式を説明することはできない。前述の核染色、ケイ光染色による観察結果と細胞長の測定結果をあわせて C. crescentus の染

染色体複製と分裂に伴う染色体分配のモデルを図13に示した。

2-4 考察

核染色法及びケイ光染色法の結果からスワーマー、ストーク両細胞が共に2箇の染色体を有すること、及び染色体の細胞内配位について両細胞には特徴的な差異があることが判明した。第1章で決定した単位娘細胞当りのDNA含量の値から、この2染色体が互いに同じ遺伝子コピーから成っていることが推定されたが、これは放射標識したDNA鎖の分配様式をオートラジオグラムで追跡することにより実証された。このような結果を総括して「スワーマー細胞は遺伝的に同一な2箇の染色体をもち、これらは複製後一方は次代のスワーマー細胞へ、他方は次代のストーク細胞へとおのおの分配される」というモデルが提出された。

一方 Osley と Newton は, C. crescentus の染色体分配についてすでに 1974 年に「1 染色体」モデルを提出している。彼らのモデルの実験的根拠は $[^3\text{H}]$ -デオキシグアノシンで DNA の一方の鎖を標識したスワーマー細胞と, この細胞の娘細胞の放射活性の分布の解析から得られたものである。しかし DNA の標識に ^3H -デオキシグアノシンを使用することにはいくつかの問題がある。すなわちこの標識法では大半の放射活性が RNA に取り込まれるので²⁸, オートラジオグラム解析前に RNA を完全に細胞から除去することが必要であり, また RNA の代謝によりパルス-チェイスを完全に行なうのが困難である。DNA にのみ取り込むことが知られている $[\text{メチル}-^3\text{H}]$ テミジンを使用した私の実験では, すでに述べたとおり, 彼らのモデルでその測定結果を説明することは全くできなかった。

娘細胞中に遺伝的に同一な染色体が2箇あるということは C. crescentus にとってどのような

な意味があるのであろうか。 Caulobacter crescentus が細胞周期中の限られた時期にのみ一定の染色体複製を行なうことから、このような多核現象は、 E. coli や B. subtilis で見られる多岐的複製 (multi-fork replication) による結果ではない。最近、他の細菌たとえば、 Micrococcus radiodurans³⁸ や Azotobacter vinelandii³⁹ 等のようにゲノム数が複数存在する例が知られ始めてきている。 M. radiodurans では遺伝情報が複数コピー存在することが、この細菌の放射線に対する強い抵抗性をささえるのに役立っていると考えられているが、このような多核性に対する一般的な意味づけはまだ未解決である。次章では C. crescentus が常に複数の遺伝子コピーを有する意義を探るための一つの手段として、放射線生物学的手法を使って研究を進める。

第3章 C. crescentus 細胞の電離放射線照射に対する感受性と標的数。

3-1 序論

前章で示したとおり, Caulobacter crescentus は増殖速度や使用した株によらず, 細胞周期をつうじて常に複数の遺伝子コピーを有している。この細菌が遺伝子を重複して有すること (redundancy of genome) の生物学的意義は何であろうか。

C. crescentus と同様に複数の遺伝子コピーを有する (4 ゲノム以上 / 細胞) と報じられている Micrococcus radiodurans³⁸ においては X 線照射に対して低線量域で著しい抵抗性を示し⁴⁰、この遺伝子の重複が標的数を増加させるとともに効率のよい遺伝子間の組み換えによる修復を可能とし、この細菌の驚異的な放射線抵

抗性に帰与していると考えられている。また、Bacillus 属の各種の胞子に対して X 線照射した場合、指数関数とは異なった S 字型の線量-効果曲線を与えたものは、複数のゲノムをもつ種である事が他の方法で確認されている。⁴¹

本章では、C. crescentus の遺伝子が重複して存在することの生物学的意義を探る一助として放射線生物学の手法を用いた。すなわち、各細胞型の γ 線照射による不活化の線量-効果曲線を調べて、その標的数とゲノム数との間の関連を検討した。またこれと付随して一定の γ 線照射に対する生存率が C. crescentus の細胞周期でどのように変化するのについても調べた。本章の結果は本論文 2 に発表した。

3-2 材料と方法

菌株

C. crescentus CB13 野生株と PYE 培地中で培養し、同調培養法はプレート選別法を使用した

(1-2 参照)。

γ線照射

同調培養して得た各種の細胞型の培養液0.1 ml ($1 \sim 2 \times 10^7$ CFU/ml) を 0°C に冷却した 10mM リン酸緩衝溶液 (pH 6.8) で 50 倍に希釈し, その 0.5ml ずつをガラスのバイアル (直径 1.2 cm) に分注する。このうち一本は未照射の対照とし, 他は 0°C において ^{60}Co による γ 線を 2 krad/min の線量率でそれぞれ指定された照射量にいたるまで照射を行なう。その後おりのを適当な希釈率で 10mM リン酸緩衝溶液で希釈し, 3 枚の PYE 寒天プレートを用い通常の上層寒天重層法により生菌数と測定した。また照射の線量率は同条件下で鉄 (Fricke) 線量計を使用して測定した。

3-3 結果

γ線照射に対する細胞の生存率と細胞周期

まず、C. crescentus のスワーマー細胞周期において一定線量 (6 krad) の γ 線照射に対する生存率がどのように変化するかと検討した。図14に示されているように、生存率は細胞周期の最初の30分間 (G₁期に相当する) にほとんど変化を示さず、スワーマー細胞とストーク細胞との間には感受性の上でほとんど差のないことが示された。しかしこの後S期の開始からG₂期に致るまで生存率の単調な増加が見られ、同調的な細胞分裂が開始するころに生存率はピークを形成する。生存率は同調的な細胞分裂の進行と共に低下して、その完了する頃にG₁期の生存率に近い極小値をもつようになる。

このように電離放射線照射に対する生存率が細胞分裂の前に増加する現象は、他の前核細胞である E. coli B/r においても観察されている⁴²。一方真核細胞と比較した場合、C. crescentus の生存率の細胞周期依存性は、G₁期の短い Chinese Hamster 培養細胞のそれ

と非常に近似しているが⁴³, C. crescentusの場合 G₂期においても高い抵抗性を有している点で差異がある。

各細胞型の生存曲線と標的数

前節で得られたr線に対する感受性の細胞周期依存性についてその原因を明確にし、C. crescentusの典型的な細胞型の標的数を決定するために、おのおのの細胞型について線量効果曲線を求めることにした。プレート選別法で得たスワーマー細胞を同調培養し、それぞれ0分(スワーマー細胞), 30分(ストック細胞), 85分(前分裂型細胞)の培養液を分取し、それぞれ24kradまでのr線を照射したところ図15の結果を得た。

スワーマー細胞の生存曲線は3オーダーにわたってほとんど指数関数的に減少しその平均致死線量は3.0kradであった。ストック細胞の生存曲線もスワーマー細胞のそれに等しく、平均致死線量は3.2kradであった。

一方前分裂型細胞では生存曲線は常プロットするといわゆるS字型となり，図15に示される如く，指数プロットの場合には外挿値約1.8を有する。また傾き自体もスワーマー，ストーク細胞より小さく平均致死線量は4.1 kradと増加している。

3-4 考察

C. crescentus の γ 線照射に対する感受性は，E. coli のそれとほぼ同じであり M. radiodurans のような高抵抗性⁴⁰は観察されなかった。また線量-効果曲線と標的説 (Target theory) を使って解釈することにより，スワーマー細胞，ストーク細胞は共に1標的を，前分裂型細胞は2標的を有することが示された。この結果から細胞内の標的数はゲノム数とは一致していないこと，すなわちスワーマー細胞やストーク細胞の2ゲノムは，放射線に対しては1標的であるという結果が得られた。このように

2コピーのゲノムをもちながらそれが1標的として挙動する事は、Bacillus 属の孢子の例⁴¹や倍數体酵母に対するX線照射の結果と異なっている⁴⁴。

この実験結果から、「C. crescentus の娘細胞中の2ゲノムは、DNA分子としては同一であるが、ある時点における遺伝子発現の調節は両DNAについて異なり、その両者が共に発現することによってのみ、C. crescentus の正常な細胞周期と増殖が可能になるのではないか」と考えられる。しかしながら、C. crescentus のDNAの修復機構が解明されていないので、B. megaterium, B. cereus, あるいは2倍体酵母のそれと大きく異なり、標的説の適応をむずかしくしている可能性も否定することはできない。

第4章 C. crescentus の核様体の単離—細胞周期における染色体の構造変化—

4-1 序論

Caulobacter crescentus の染色体についてその複製時期（第1章）、細胞内での存在位置、及び細胞分裂時における娘細胞への分配様式（第2章）について解明してきた。そこで本章ではこの染色体と実際に単離してその構造上構成タンパク成分上の細胞周期内での変化をとらえようと考えた。

前核細胞から染色体構造を単離する方法としていくつかの方法が提出されてきたが、その中で、PettijohnらがE. coli を材料として開発した folded chromosome（以下核様体と訳す）の単離法は^{45,46}、その温和な単離条件によりすぐれた方法であると考えられ広く使用されてきて

いる。⁴⁵⁻⁵³ E. coliの場合、核様体の単離法の条件を若干かえることにより膜のある核様体(Envelope-associated folded chromosome)⁴⁵と膜のない核様体(Envelope-free folded chromosome)⁴⁷とを区別して単離することが出来る。

前者はタンパク成分の主成分として膜タンパクを有し構造上比較的安定であり、in vitro複製系の基質としても使用される⁴⁸。しかしこの核様体では特異的なDNA配列が細胞膜と結合しているのではない^{49,50}ことが示されているばかりでなく、細胞の生理条件⁵¹、容菌条件⁵²が、核様体の沈降速度や回収率に微妙な影響を与えることも知られている。

そこで C. crescentus の細胞周期の各過程でのDNA上の構造変化やDNA結合タンパクを検出する為には膜のない核様体の方が適していると考え、膜画分を可溶化する能力の高い界面活性剤、サルコシルの存在下で C. crescentus と処理して膜を含まない核様体を単離する方法を確立し、その方法を用いて細胞周期の各

過程における染色体の構造の研究を行なった。本章の結果については、現在投稿準備中である。

4-2 材料と方法

菌株及び同調培養法

C. crescentus CB13 tdr806B35R4 と HMG 培地中で増殖させ、プレート選別法を用いてスワーマー細胞周期の各細胞型を調製した(1-2 参照)。DNA を標識した各細胞型を使用する時には 2-2 で述べた方法に従い前世代の S 期において ^3H テミジンでパルス-フェイスを行なって標識した。

膜のない核様体の単離法

E. coli において Hecht⁵³ が使用した単離法を改変して使用した。C. crescentus の細胞 (8×10^7 細胞以下) を低速遠心 (3,000 g, 6 分) で沈殿させ、これを 0.2 ml の緩衝溶液 A' [10mM Tris-

HCl (pH 8.2 at 4°C), 1.0 N NaCl, 125 μ M aurintricarboxylic acid (ATA)] に懸濁する。0°C において 0.05 ml の緩衝溶液 B' [0.12 M Tris-HCl (pH 8.2), 0.05 M EDTA 4 mg/ml 卵白リゾチーム, 1 M NaCl] を添加して 45 秒間 0°C で処理する。さらに緩衝溶液 C' [1% Brij-58, 0.4% デオキシコール酸ナトリウム, 1 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% N-ラウロイルサルコシンナトリウム (サルコシル)] を添加して 25°C 5 分間保温して溶菌を完了する。

B' 緩衝溶液の処理時間を短かくすると、核様体分画への DNA の回収率が低下し、反対に長くすると核様体の沈降係数の再現性が悪くなり 45 秒処理に比し S 値が低下する場合が見られた。

ショ糖密度勾配遠心法

溶菌液は 0°C に冷却後、緩衝溶液 D (10 mM Tris-HCl (pH 8.2), 1.0 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール) を含む 12 ml の 10-30% のショ糖密度勾配にのせ、4°C において日立 RPS40T

ロ-タ中で超遠心 (17,000 rpm, 50分) を行なう。超遠心は溶菌完了後から10分以内に開始し、遠心後23-24フラクションに分取して各フラクションの0.05~0.4ml中の10% TCA不溶画分の放射活性と測定した。エチジウムブロマイド存在下のショ糖密度勾配遠心の場合には緩衝溶液D中にエチジウムブロマイドを指定濃度添加して遠心とおこなった。沈降係数のマーカーとして³⁵S-アミノ酸で標識したT4D株を使用した。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動とフルオログラフィー。

³⁵Sメチオニンで標識された核様体タンパク質の画分にTCAを添加し最終濃度を10%とする。これを0°Cで12時間保温し生じた沈殿を低速遠心で回収、アセトンで2回洗う。このタンパク標品に0.1mlのゲル標品緩衝溶液 (0.0625M Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 10% グリセリン, 5% 2-メルカプトエタノール, 0.001% ブロモフェノール・ブルー) 中に可溶化し100°C 2分

間処理してゲル標品とした。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、
Laemmli⁵⁴の方法に準拠し、12%平板ゲル⁵⁵を使用しておこなった。タンパク質のバンドの検出には Laskey⁵⁶らの方法に従ってフルオログラフィーを行なった。

試薬類

リファンピシン及びATAはシグマ社から、また卵白リゾチームは生化学工業社からそれぞれ購入した。[メチル-³H]チミジン (50 Ci/mmol) [5-³H]ウラシル (25 Ci/mmol), L-[³⁵S]メチオニン (1100 Ci/mmol) は New England Nuclear 社から購入した。

4-3 結果

膜のない核様体の単離

数世代に渡って ³HチミジンでDNAを標識した対数増殖期にある C. crescentus を4-2に述べ

た方法に従って溶菌し、~~シ~~糖密度勾配遠心法で解析したところ図16 Aに示す沈降パターンが得られた。溶菌液に加えたマーカーのT4の沈降係数が1025Sであることから⁵⁷、約1500Sから1600Sのピークをもつ大きな構造体中にDNAの大部分が回収されることがわかり、遠心管底部や最上部にはDNAはほとんど存在しない。

E. coliでは膜のない核様体のピークの沈降係数は1600~1700Sと報告されており、C. crescentusのそれよりやや大きい。これはC. crescentusのkinetic complexityがE. coliのそれにはほぼ近いやや小さいという報告³³とより一致を示しており、この核様体のS値の大きさはゲノムの大きさを忠実に反映しているといえる。

溶菌に際してATAを添加しておかないと、S値が1~2割減少する場合が多いが、この核酸分解酵素阻害剤を最終濃度50 μ M加えることにより沈降速度の再現性が著しく高まった。
恐らく菌体内の種々の核酸分解酵素の阻害に⁵⁸

役立っていると考えられる。

また、 ^{35}S -メチオニンでタンパク質をパルスラベルした対数増殖期の菌を同様の方法で解析すると、放射活性のほとんどは最上部のフラクションに残るが、全体の約2%の画分はDNAのピークと同じ沈降速度のところにピークを形成した(図16B)。 ^{35}S メチオニンで数世代培養した細胞でも同様に約2%のタンパク成分がDNAと共に沈降した。

次に核様体のRNA成分に検討を加えた。 ^3H ウラシル($250\mu\text{Ci}/\text{ml}$)で2分間のパルスラベルをした場合全放射活性の約60%が核様体画分に回収され、新しく合成されたRNAのほとんどが核様体と結合していることがわかる(データは示していない)。 E. coliの場合と同様に⁴⁶、このような新しく合成されたRNAが、C. crescentusの核様体の構造の維持に必須であることは、この構造体が $10\mu\text{g}/\text{ml}$ リファンピシン添加後5分以内に破壊される事実(データは示していない)から示唆されている。

細胞周期中の核様体の沈降係数

前世代のS期においてDNAをパルス-チェイス法で標識したスワーマー細胞を得て、これを同調的に増殖することによりDNAが標識された各種の細胞型を得た。これらの細胞から核様体を単離するとその沈降パターンは図17に示すようになった。

G₁期にある、スワーマー細胞（同調培養開始直後）及び同調開始後40分の細胞では核様体のピークの沈降係数はともに1260S付近でありこの時期にはS値上に大きな変化はない。ストーク細胞になると（同調開始後60分）ピーク的位置はずれないものの、沈降係数の大きな画分の存在比が高まっている。S期の進行に伴って核様体ピークの沈降係数は1590S（90分）、1940S（120分）と順次増加した。

この沈降係数における1260Sから1940Sへの1.54倍の変化は、複製前の核様体を剛体球であると仮定し、さらに複製完了時にはこの剛体球が2箇、一点で接着した構造をしてい

ると仮定した場合の変化率(1.50倍)⁵⁹とほぼ一致する。従ってこの S 値の変動は複製過程とかなり忠実に反映していると考えられる。

S 期後期から G_2 期初期に相当する同調培養開始後140分の細胞では、ピーク部分の沈降係数は著しく低下して1350 S 付近にまでなる。同調的な細胞分裂を開始していないこの時期の細胞の核様体がすでにスワーマー細胞やストーク細胞の核様体の大きさにほぼ近くなっていることは、複製で2倍化した核様体が細胞分裂の前にすでに分離(segregation)を完了していることを示している。

核様体DNAの超らせん濃度

3Hチミンで数世代に渡って標識した対数増殖期にある *C. crescentus* の細胞から核様体を単離し、種々の濃度のエチジウム・ブロマイドを含んだショ糖密度勾配により遠心分析をした。この結果、図18に示したとおり、核様体のピークは $2\mu\text{g/ml}$ のエチジウム・ブロマイド存在下

で極小値を持つことがわかる。このことから核様体 DNA の超らせん濃度 (superhelical concentration) は closed circular DNA⁶⁰ や、*E. coli* の膜のない核様体⁴⁷ のそれと同様 400 塩基対 / 回転であることがわかる。

この超らせん構造が、染色体の複製周期にもなって変化するか否かを調べる為に、複製期と非複製期の核様体それぞれについて超らせん濃度を求め、比較することにした。複製期にある核様体は、対数増殖している細胞を 10 分間 ^{32}P チミジンでパルスラベルしたものから単離し、一方複製期にはない核様体は 4-2 に述べた方法により DNA を標識したスワーマー細胞から得た。その結果、前節の結果から予想されるとおり複製期の核様体は、非複製期の核様体より大きな S 値をもつものの、どちらの場合にも $2\mu\text{g/ml}$ のエチジウム・ブロマイドの濃度で沈降係数は極小値をもつことが示され (図 18) 両者の DNA の超らせん濃度は、実験誤差範囲内でほぼ等しいことが示された。

核様体構成タンパク質の細胞周期依存性。

図16Bに示した密度勾配中の各フラクションのタンパク成分を分析すると、核様体画分のタンパク質はほぼDNAと同様の分布で存在し、密度勾配の上層や底部から尾をひきながら混入してくるタンパク種は見られなかった(データは示さない)。このことから核様体の単離はDNA結合タンパクの分画法として有用であると考えられるので、この核様体構成タンパクの細胞周期中での変化を調べた。

³⁵Sメチオニンでタンパク質を15分間パルスラベルしたスワーマー細胞周期中の種々の細胞型をプレート選別法で調製し、その核様体結合タンパクの沈降パターンを調べた結果を図19に示す。図16Bと同様に全タンパク質の約2%の画分がピークを形成し、その沈降速度の細胞周期中での変化の仕方は、図17で示したDNA標識細胞のそれとほぼ合致して複製の進行に伴う体積増加が検出された。

図19に示された各核様体ピークの6フラク

ションと回収しそのタンパク質成分を SDS-ポリ
アクリルアミドゲル電気泳動で分析した(図
20)。その結果, パルスラベル後に核様体に
回収されるタンパク種のうち, いくつかはその
存在比がスワーマー細胞周期中で著しく変
化することが判明した。例えば, 分子量が
69,000 のタンパク質(以下 69K と略す), 42K
38K 及び 21K タンパク質は G₁ 期の後期(30分)
から S 期の開始期においてその存在比が著し
く高い。一方, 31K, 27K タンパク質は, それ
ぞれスワーマー細胞(0分), 前分裂型細胞(
130分)において存在比が高い。このような,
stage-specific なタンパク質は特定の時期に合
成され染色体の複製や転写レベルでの遺伝子
発現の調節に関与している可能性が高い。核
様体タンパクの主成分中には, E. coli の膜のな
い核様体の場合と同様に, DNA 依存 RNA ポリ
メラーゼの α , β 及び β' サブユニット^{14,15} が存在し,
すべての細胞周期を通じて観察される。

4-5 考察

E. coli の核様体の研究においては、低い DNA の回収率でありながら、得られた核様体の構造の変化を論じた事例がいくつかみられたが^{47, 61} 数例についてはそれに由来する誤りが指摘されている⁵¹。そこで本実験では、すべての細胞型について同一溶菌条件で処理してその DNA のほとんどと膜のない核様体画分に再現的に回収する方法を開発し、その核様体の細胞周期における構造変化を追跡した。その結果、核様体は S 期における体積を増加して最終的に 2 倍となり、さらに細胞分裂前の G₂ 期にこれが物理的に分離を完了することが確かめられた(図 17)。また核様体 DNA の超らせん構造に関しては複製期の否かにかかわらず通常のプラズミドやウイルスと同様に 400 塩基対/回転の負の *superhelical turn* を有することがわかった。

3 章で述べたようにスワーマー細胞とスト

一ノ細胞にはおのおの、ゲノムとして同一な2箇の染色体が存在するが、その染色体の分離の程度に差が見られている。しかし単離した核様体は2つの細胞で同一のS値を示しており、このことからスワーマー細胞内の近接している2箇の染色体も、ストーク細胞の場合と同様に物理的にはすでに互いに分離を完了しており、従って染色体は複製開始前の1260S核様体として回収されたと考えられる。

Evinger と Agabian は、C. crescentus のスワーマー細胞とストーク細胞から、それぞれについて異なった溶菌条件を用いて膜のある核様体を単離している^{62,63}。この核様体は両娘細胞間で非常に大きな沈降速度上の差があり(スワーマー細胞核様体, 6000S以上; ストーク細胞核様体, 約3000S), 彼らはこれが細胞分化の過程を反映しているのではないかと考えている。しかしながら、このような大きなS値の差はその構成々分上の差異からは説明することができなかった。一方、本章で示した如くすべ

その細胞型から同一溶菌条件で回収率良く膜のない核様体を単離した場合には、スワーマー細胞からストーク細胞へ変化する期間中にはほとんど構造変化はおこっていないことが確かめられた。従って Evinger と Agabian が観察した膜のある核様体の沈降速度上の変化は少なくとも DNA 上におきた構造変化を反映するものではないと考えられる。

本章で分析した核様体結合タンパクには予想されたとおり C. crescentus CB13 株で報告されている外膜特有のタンパク質⁶⁴は主成分中にはほとんど検出されず、DNA 結合タンパク質の分析が可能であると考えられる。図 20 に示したとおり、パルスラベル後核様体に回収されるタンパク質には細胞周期に依存した変動がいくつかのタンパク質について見い出された。このような変化はそのタンパク質の合成のレベルで生じたのか、またはそのタンパク質の核様体結合能上のレベルで生じたものであるかはこの実験からだけでは断定できないが、

この様なタンパク質群の変化の多くが染色体複製の開始期や細胞分裂期を節目として生じていることは、細胞周期の制御に積極的に関与していることを示唆しており、その機能の重要性が期待される。しかし残念ながら、これらのタンパク質の機能について直接同定されているものはまだない。

結語

本研究では特徴的な細胞周期を有し、非対称分裂によって増殖する Caulobacter crescentus の染色体に注目し、その複製の時期、細胞内の配位、分配の様式等と分裂・分化過程との相関関係を生化学的手段を中心にして検討してきた。C. crescentus の細胞周期における染色体の複製・分離・分配の様式については第1章、第2章の結果をまとめて、モデルとして図13に示した。さらに第4章で得た単離した核様体の分析結果を考慮に加えて以下にこれを総括する。

スワーマー細胞中には、ゲノムとして同一な2つの染色体があり互いに近接して存在しているが、これらはDNA分子としては互いに分離を完了している。スワーマー細胞が伸長し、細胞分化をしてストーク細胞となる過程

で、この2箇の染色体は、はっきりと分離し、やがてそれぞれが染色体複製を開始する。

G₂期には、どちらの複製した染色体もDNA分子としての分離をおえて、一つの前分裂型細胞内でそれぞれ次代のスリーマー細胞とストック細胞の染色体配位の準備をおこなう。そしてこれにひき続く非対称分裂において染色体の配位は異なるが、DNA量としては等量の遺伝子が2娘細胞へと分配されることになる。

なぜ Caulobacter crescentus の娘細胞が2ゲノムを有するのか、その生物学的な意義は興味深い。前述したとおり染色体複製時期が細胞周期中の一定時期にのみ限られていることからこれは多岐的複製の結果生じたものとは考えられない。第3章で示されたように、両娘細胞のγ線照射に対する不活化の感受性が1標的を示す事から、2染色体が互いに異なった遺伝子発現をしていて非対称分裂による細胞増殖と遂行するうえで機能分担を行なっている可能性が強いと考えている。

スワーマー細胞とストーク細胞には遺伝子発現に質的・量的な差異が見い出されているが細胞周期の観点からは図13に総括されるように2細胞には複製開始能の有無に決定的な差異が見い出された。このように小型細胞がただちには染色体複製を開始できないという現象は、Caulobacter crescentusと同様に非対称分裂とする Saccharomyces cerevisiae においても観察されており⁶⁵、budding で生じた小型細胞では、ほぼ母細胞の大きさになるまでDNA複製をおこなわずに細胞体積を増加すると報じられている。

一方、E. coliにおいても細胞がある一定体積を持つに至った時に初めてDNA複製が開始するという考え方²¹が広く受け入れられている。このような現象をささえる制御機構として、細胞内でその濃度が一定に保たれる可溶性タンパク質であるオートリプレッサー²³の存在を決定し、同じプロモーターの制御下にあるイニシエーターが細胞の体積を間接的に認識して

いるという仮説も提出されている。

しかしながら、分裂直後の2娘細胞の染色体に複製開始能の差がある *C. crescentus* の場合は、オートリプレッサーといった可溶性タンパク質による制御のみでは説明が困難である。両娘細胞中の2染色体の分離の程度に著しい差異があり、このような染色体の配位は前分裂型細胞においてほぼ準備されていること(第2章)、両娘細胞の核様体構成タンパク上に差異があること(第4章)から、前分裂型細胞の、両細胞極中にそれぞれ存在する1対の染色体の間には、構造・機能上の差異がすでに少なくとも部分的には生じていることが推察される。

このように1つの細胞中において染色体機能が極性化を達するという概念は、先にJ-線照射実験の結果から提出した“2染色体の機能分担”の仮説とも合致する。これの実証には、娘細胞中に存する2染色体の差異を記述することが必須であるが、現在のところ2者

を生化学的に分画する試みは成功してはいない。

謝辞

本研究を進めるにあたり一貫して私を指導し、勇気づけて下さった指導教官の岡田吉美教授に深く感謝致します。また助言と討論にあたって下さった福田昭男助手、ならびに岡田研究室の皆様に感謝致します。

1. Iba, H., Fukuda, A. and Okada, Y. (1977) Chromosome replication in Caulobacter crescentus growing in a nutrient broth. J. Bacteriol 129:1192-1197.
2. Iba, H., Fukuda, A. and Okada, Y. (1977) Gamma-ray sensitivity during synchronous cell differentiation in Caulobacter crescentus. J. Bacteriol. 131:369-371.
3. Iba, H. and Okada, Y. (1980) Chromosome segregation in an asymmetrically dividing bacterium, Caulobacter crescentus. J. Mol. Biol. 139:733-739.

1. Piggot, P. J. and Coote, J. G. (1976) *Bacteriol. Rev.* 40:908.
2. Szulmajster, J. (1979) *Trends in Biochem. Sci.* 4:18.
3. Poindexter, J. S. (1964) *Bacteriol. Rev.* 28:231.
4. Shapiro, L. (1976) *Annu. Rev. Microbiol.* 30:377.
5. Osley, M. A., Sheffery, M and Newton, A. (1977) *Cell* 12:393.
6. Schmidt, J. S. (1966) *J. Gen. Microbiol.* 45:347.
7. Shapiro, L. and Agabian-Keshishian, N. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 67:200.
8. Terrana, B. and Newton, A. (1975) *Dev. Biol.* 44:380.
9. Iba, H., Fukuda, A. and Okada, Y. (1975) *Japan. J. Microbiol.* 19:441.
10. Fukuda, A., Miyakawa, K., Iba, H. and Okada, Y. (1976) *Virology* 71:583.
11. Newton, A. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69:447.
12. Iba, H., Fukuda, A. and Okada, Y. (1978) *J. Bacteriol.* 135:647.
13. Cheung, K. K. and Newton, A. (1977) *Dev. Biol.* 56:417.
14. Bendis, I. K. and Shapiro, L. (1973) *J. Bacteriol.* 115:848.
15. Iida, H., Ikehara, K. and Okada, Y. (1979) *FEBS lett.* 99:346.
16. Fukuda, A., Miyakawa, K. and Okada, Y. (1974) *Proc. Japan Acad.* 50:839.
17. Fukuda, A. and Okada, Y. (1977) *J. Bacteriol* 130:1199.
18. Fukuda, A., Iba, H. and Okada, Y. (1977) *J. Bacteriol.* 131:280.
19. Jacob, F., Brenner, S. and Cuzin, F. (1963) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28:329.

20. Cooper, S. and Helmstetter, C. E. (1968) J. Mol. Biol. 31:519.
21. Donachie, W. D. (1968) Nature 219:1077.
22. Helmstetter, C. E. and Pierucci, O. (1968) J. bacteriol. 95:1627.
23. Sompayrac, L. and Maaløe, O. (1973) Nature New Biol. 241:133.
24. Gudas, L. J. and Pardee, A. B. (1974) J. Bacteriol. 117:1216.
25. Cooper, S. (1979) Nature 280:17.
26. Yoshikawa, H., O'Sullivan, M. A. and Sueoka, N. (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 52:973.
27. Donachie, W. D., Martin, D. T. M. and Begg, K. J. (1971) Nature New Biol. 231:274.
28. Degnen, S. T. and Newton, A. (1972) J. Mol. Biol. 64:671.
29. Schneider, W. C. (1957) in Methods in Enzymology. S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds Vol. 3. pp680. Academic Press, New York.
30. Burton, K. (1956) Biochem. J. 62:519.
31. Degnen, S. T. and Newton, A. (1972) J. Bacteriol. 100:852.
32. Lehninger, A. L. (1975) in Biochemistry, 2nd ed. pp859. Worth Publishers, Inc., New York.
33. Wood, N. B., Rake, A. V. and Shapiro, L. (1976) J. Bacteriol. 126:1305.
34. Osley, M. A. and Newton, A. (1974) J. Mol. Biol. 90:359.
35. Přečaud, M. (1954) Ann. Inst. Pasteur (Paris) 86:787.
36. Hecht, R. M., Taggart, R. T. and Pettijohn, D. E. (1975) Nature 253:60.
37. Lark, K. G. and Bird, R. E. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71:779.
38. Hansen, M. T. (1978) J. Bacteriol. 134:71.

39. Sadoff, H. L., Shimei, B. and Ellis, S. (1979) J. Bacteriol. 138:871.
40. Lett, J. T., Caldwell, I. and Little, J. G. (1970) J. Mol. Biol. 48:395.
41. Hitchins, A. D. (1976) J. theor. Biol. 58:97.
42. Helmstetter, C. E. and Uretz, R. B. (1963) Biophys. J. 3:35.
43. Sinclair, W. K. and Morton, R. A. (1966) Radiat. Res. 29:450.
44. Nakai, S. and Matsumoto, S. (1967) Mutation Res. 4:129.
45. Stoington, O. G. and Pettijohn, D. E. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68:6.
46. Pettijohn, D. E. and Hecht, R. (1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38:31.
47. Worcel, A. and Burgi, E. (1972) J. Mol. Biol. 71:127.
48. Kornberg, T., Lockwood, A. and Worcel, A. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71:3189.
49. Meyer, M., De Jong, M. A., Woldringh, C. L. and Nanninga, N. (1976) Eur. J. Biochem. 63:469.
50. Drlica, K., Burgi, E. and Worcel, A. (1978) J. Bacteriol. 134:1108.
51. Korch, C., Øvrebø, S. and Kleppe, K. (1976) J. Bacteriol. 127:904.
52. Meyer, M., De Jong, M. A., Woldringh, C. L. and Nanninga, N. (1976) Eur. J. Biochem. 65:409.
53. Hecht, R. M., Stimpson, D. and Pettijohn, D. (1977) J. Mol. Biol. 111:257.
54. Laemmli, U. K. (1970) Nature 227:680.
55. Studier, F. W. (1973) J. Mol. Biol. 79:237.
56. Laskey, R. A. and Mills, A. D. (1975) Eur. J. Biochem. 56:335.
57. Cummings, D. (1964) Virology 23:408.
58. Hallick, R. B., Chelm, B. K., Gray, P. W. and Orozco, E. M., Jr. (1977) Nucl. Acid Res. 4:3055.

59. Kirkwood, J. G. (1954) J. polym. Sci. 12:1.
60. Crawford, L. V. and Waring, M. J. (1967) J. Mol. Biol. 25:23.
61. Worcel, A. and Burgi, E. (1974) J. Mol. Biol. 82:91.
62. Evinger, M. and Agabian, N. (1977) J. Bacteriol. 132:294.
63. Evinger, M. and Agabian, N. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76:175.
64. Agabian, N. and Unger, B. (1978) J. Bacteriol. 133:987.
65. Hartwell, L. H. and Ungar, M. W. (1977) J. Cell. Biol. 75:422.

図表及びその説明

表

第 1 章

表 1 , 表 2

図

序 章

図 1 , 図 2

第 1 章

図 3 ~ 図 6

第 2 章

図 7 ~ 図 13

第 3 章

図 14 ~ 図 15

第 4 章

図 16 ~ 図 20

表 1. C. crescentus の単位細胞当りの
DNA-含量。

Cell type	Expt 1		Expt 2	
	Viability a)	Cell no. b)	Viability a)	Cell no. b)
The swarmer cell	0.89	0.91	1.04	1.03
The stalked cell	0.94	1.02	1.05	1.07

a) Micrograms of DNA per colony-forming unit $\times 10^8$.

b) Micrograms of DNA per cell number $\times 10^8$.

表 2. C. crescentus の細胞周期の各時間
についての総括

Strain	Medium	The swarmer cell cycle			The stalked cell cycle	
		G ₁	S	G ₂	S	G ₂
CB 13 wild type	PYE	30	50	35	50	35
CB 13 <u>tdr</u> -806B35R4	HMG	60	100	40	100	40
CB 15 wild type*	HMG	65	85	30	90	30

*は、文献28から引用した。
数字は分単位である。

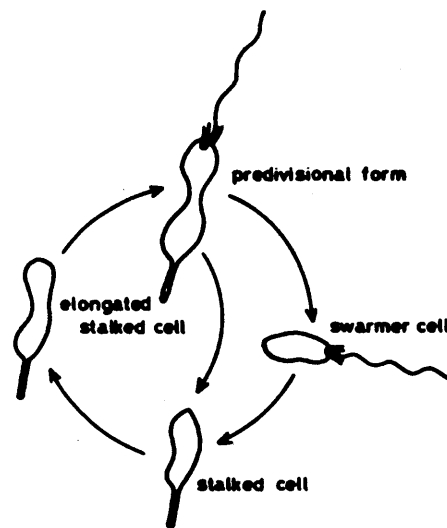


図 1. Caulobacter crescentus の細胞周期

前分裂型細胞 (predivisional form) は非対称分裂をしてべん毛を有して運動性のスワーマー細胞 (swarmer cell) とストークを有するストーク細胞 (stalked cell) にわかれる。

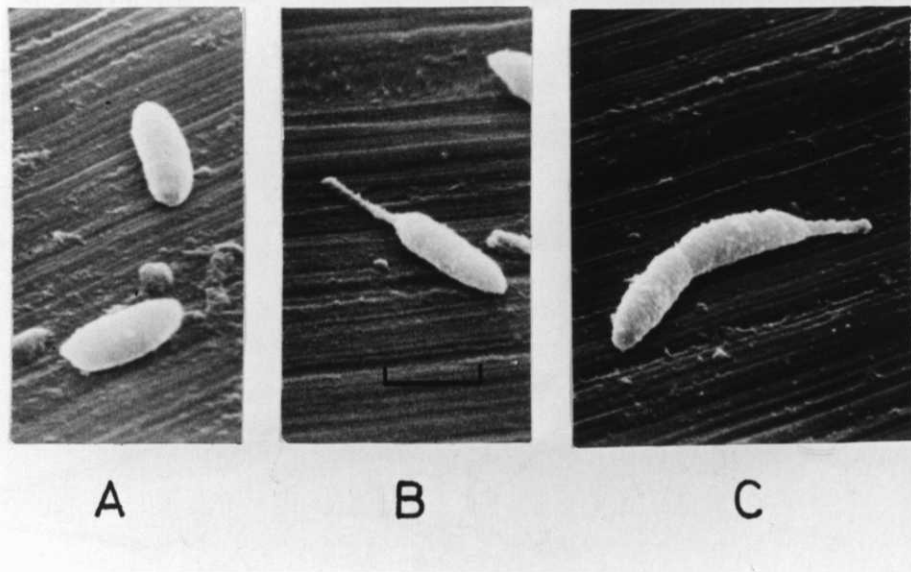


図2. Caulobacter crescentus の走査型電子顕微鏡写真。

A. スワーマー細胞

B. ストローフ細胞

C. 前分裂型細胞

一般に走査型電子顕微鏡ではべん毛，線毛は観察されていない。横棒は $1\mu\text{m}$ と示す。

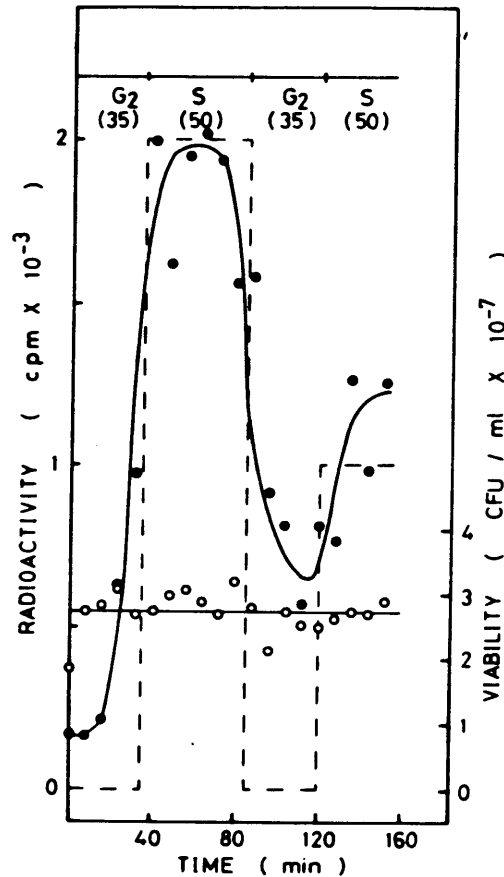


図3. フレート培養液中に放出されてくるスワーマー細胞の生菌数とDNA中の放射活性。

ガラスプレートの底面に吸着し、スワーマー細胞を産生・放出している細胞と、新鮮なPYE培地で数回洗った後、³H-デオキシアデノシン (23 μ Ci/ml) と含むPYE培地 (3ml) で10分間パルスラベルを行なう。その後吸着している細胞と非放射標識のデオキシアデノシンと20 μ g/ml を含むPYE培地で注意深く洗っ

でチエイヌをおこはひ、この培地 5 ml を加えて 30℃ でゆるやかに振盪培養する。8 分間培養後、培養液をつぎ移して回収し、そのうち 0.05 ml を生菌数測定に、4 ml を DNA 中の放射活性の定量にそれぞれ使用する。プレートには、ただちに非放射標識のデオキシアデノシン 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む PYE 培地を再び 5 ml 加え上述の培養・回収の操作を 8 分間隔で 20 回くりかえし、おのおの生菌数(○)と DNA の放射活性(●)を定量した。図の上部にこの結果に基づき算定した細胞周期と、その所用時間とを記し、これから期待される理論曲線と破線で示した。

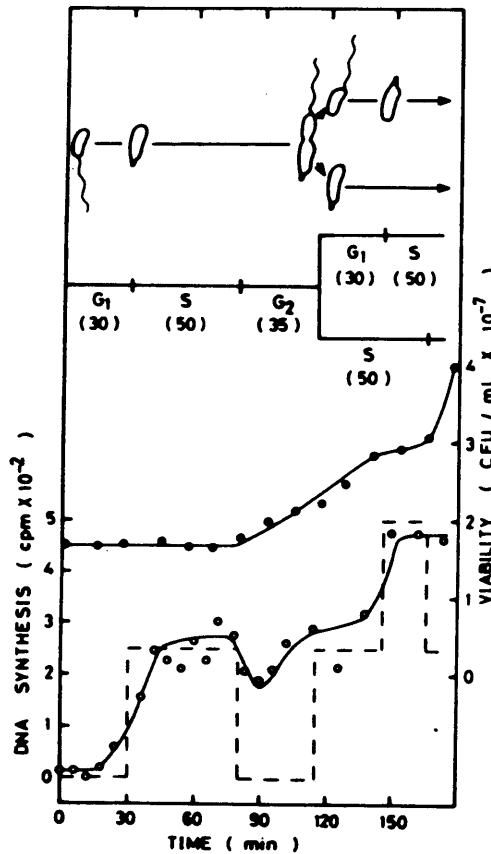


図 4. 同調的に増殖している *C. crescentus* の DNA 合成活性。

プレート選別法で得られたスワーマー細胞を PYE 培地中 (8 ml) で増殖させる。この間培養液中から 0.05 ml をとって生菌数 (●) を測定する。またそれぞれの示された時間に 0.1 ml づつを分取し ^3H -デオキシアデノシン ($16.7 \mu\text{Ci/ml}$) で 8 分間パルスラベルを行なう。2 ml の 10% TCA を添加して反応を停止し、DNA 中の ^3H の放射活性を定量する (○)。図の上部に、

この結果から得られた細胞周期とその所用時間
間を示し、そのDNA合成の理論曲線と破線で
示した。

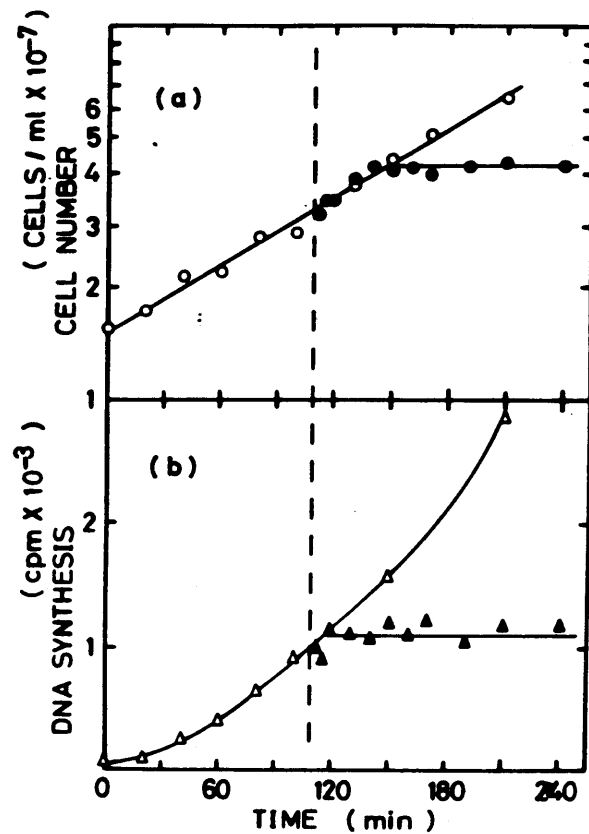


図 5. DNA合成の阻害による細胞分裂の停止。

対数増殖している *C. crescentus* CB13 培養液 50ml に $[^3\text{H}]$ デオキシシアデノシン ($3.2 \mu\text{Ci/ml}$) を添加する。示された時間に、細胞数 (a) 及び DNA 中の放射活性 (b) を定量する。縦の破線で示された時間に培養液を等分し、一方には最終濃度 4mg/ml となるように粉末のハイドロキシウレアを添加し他方は未処理のままに培養と継続する。●及び▲は、ハイドロキシ

ウレアを添加した培養液の細胞数と ^3H 放射活性とそれぞれ示し、○及び△は非添加の培養液の細胞数と ^3H 放射活性を示す。

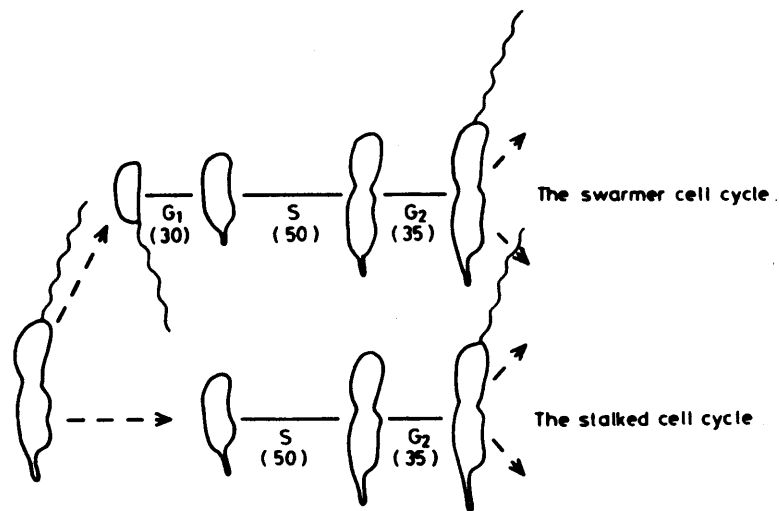


図 6. *Caulobacter crescentus* の栄養培地
中における細胞周期の模式図。

()の中の数字は, その時間を分単位で示したものである。

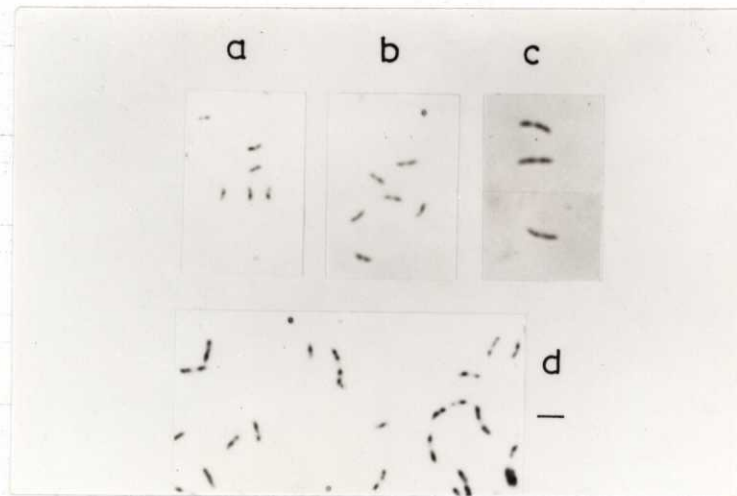


図 7. 核染色した *C. crescentus* 各細胞型の光学顕微鏡観察。

スワーマー細胞をプレート選別法で調製しこれを PYE 培地中で 0 分, 30 分, 85 分培養することにより, それぞれスワーマー細胞, ストック細胞, 前分裂型細胞の標品を得た。これらを, 2-2 に従って Priechaud の方法で核染色し, 光学顕微鏡下で観察した。一方, HMG 培地中で対数増殖する細胞についても, 同様に核染色をおこなった。

a. スワーマー細胞 (PYE 培地)

b. ストック細胞 (PYE 培地)

c. 前分裂型細胞 (PYE 培地)

d. 対数増殖期の細胞 (HMG 培地)

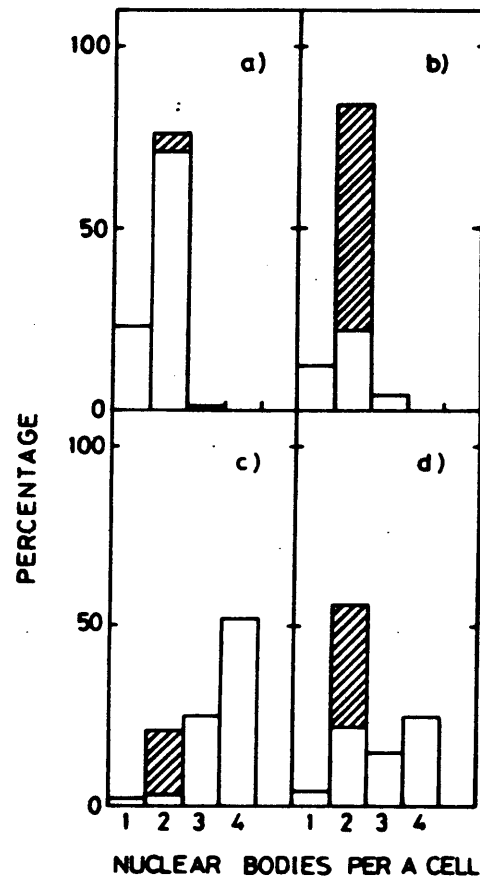


図8. 細胞あたりの染色体数の統計

図7に示したのと同様の光学顕微鏡写真と利用し各細胞型について約200細胞を観察して各細胞中の染色体数を計測した。2つの染色体が互いに約 $0.4\mu\text{m}$ 以内に位置している時と近接している2染色体と定義しそれ以上離れている場合と、はっきり分離した2染色体として棒グラフ中に斜線で示した^{注)}。a, b, c, dはそれぞれ図7のa, b, c, dに対応する。

^{注)}細胞当り染色体が3つおよび4つ観察される場合には、このような分別を行っていない。

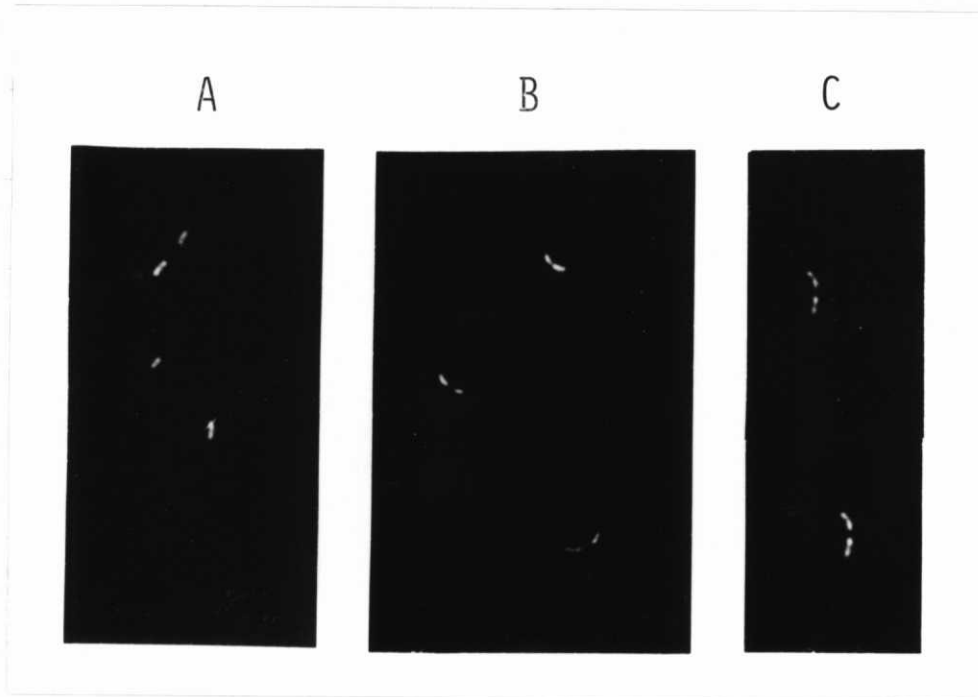


図9. DNAとケイ光染色した *C. crescentus* 各細胞型のケイ光顕微鏡写真。

スワーマー細胞とプレート選別法で得て、これをPYE培地中で0分、65分、85分培養することにより、それぞれスワーマー細胞、染色体複製期（S期）の細胞（伸長ストーク細胞）、前分裂型細胞の標品を得た。これらと2-2に従ってDNAとケイ光染色してケイ光顕微鏡下で観察した。

- a. スワーマー細胞
- b. 伸長ストーク細胞
- c. 前分裂型細胞

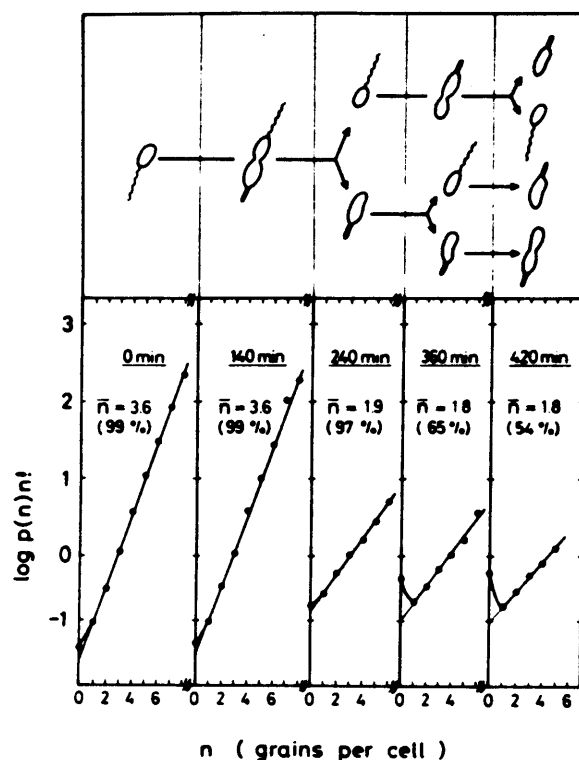


図 10. 同調的に細胞分裂している *C. crescentus* CB13 *tdr-806* B35 R4 の単位細胞当りのグレイン数の分布

DNA分子の一方の鎖のみを³Hチミジンで標識したスワーマー細胞を2-2に従って得る。これを30°Cで培養し、示された時間に一部を分取して、2-2の方法により細胞のオートラジオグラムを作製する。1.75日の露光の後に現像し、1500倍の倍率で1標品につき約400細胞を位相差顕微鏡下で観察して単位細胞当りのグレイン数を計測した。結果は単位細胞

当りのグレイン数 (n) に対し $\log p(n)n!$ をプロットした。ここで $p(n)$ はグレイン数を n 箇有する細胞の出現頻度である。図上部に、図11の増殖曲線に基づきその時間に対応する同調的な増殖を模式的に図示した。

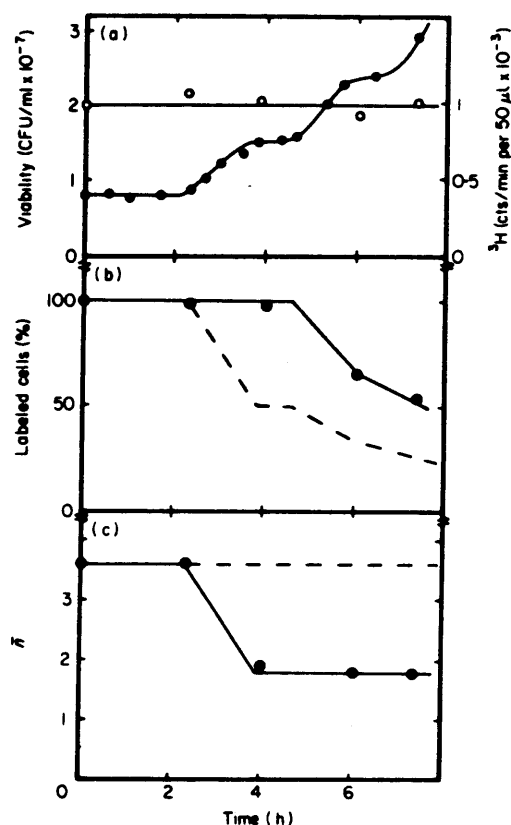


図 11. 同調的に増殖している *C. crescentus* CB13 tdr-806 B35R4 培養液中の生菌数, 標識細胞の存在率, 及び標識細胞の平均グレイン数。

DNA分子の一方の鎖のみを放射標識したスワーマー細胞を培養し, この培養液中の生菌数(●), 10% TCA 不溶画分中の放射活性(○)を測定した(a)。標識された細胞の存在率(b), 及び標識された細胞の平均グレイン数(\bar{n})(c), は図10のプロットから算出した。

(b)と(c)に示された実線及び破線は, それぞ

れ, "2 染色体モデル及び"1 染色体モデルから
期待される理論曲線を示す。

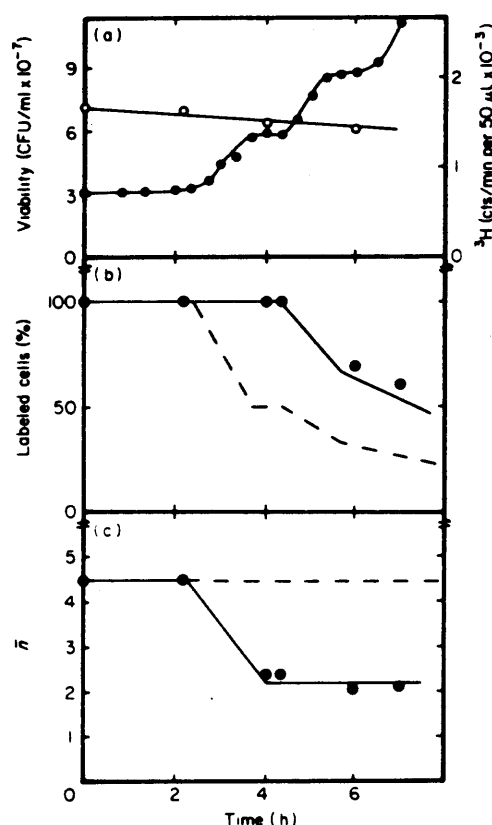


図 12. 同調的に増殖している *C. crescentus* CB15 野生株培養液中の生菌数，標識細胞の存在率，及び標識細胞の平均グレイン数。

DNA分子の一方の鎖のみと放射標識したスフーマー細胞と培養し，この培養液中の生菌数(●)，10% TCA 不溶画分中の放射活性(○)を測定した(a)。同時に培養液の一部を取ってオートラジオグラムとおこない4日間の露光後に現像する。標識された細胞の存在率(b)と標識された細胞の平均グレイン数(c)を図10

と同じ方法で解析した。(b)と(c)に示された実線及び破線はそれぞれ, "2染色体"モデル及び"1染色体"モデルから期待される理論曲線と示す。

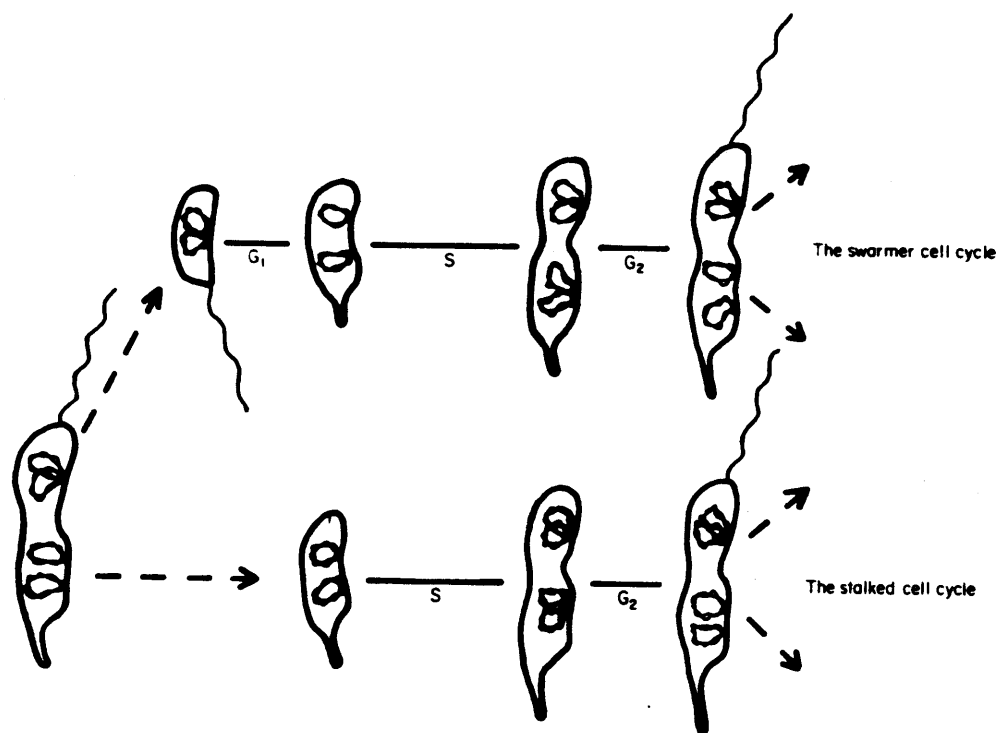


図 13. *C. crescentus* の染色体複製と染色体分配に関するモデル。

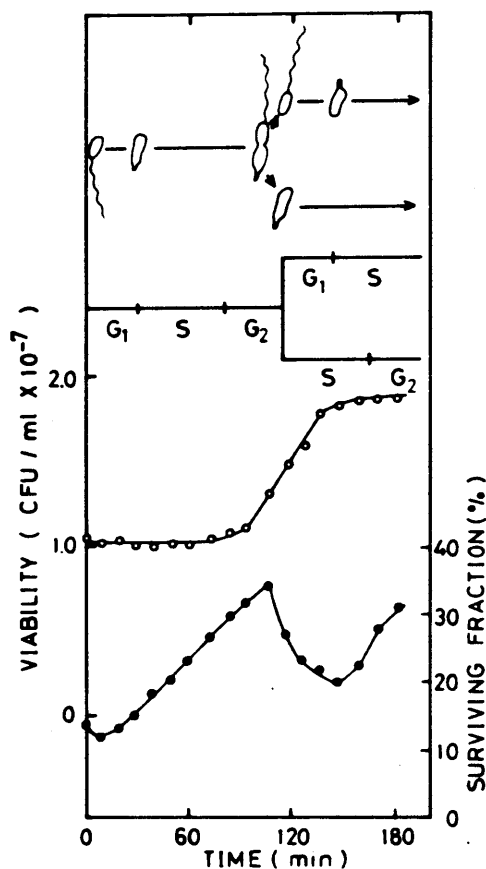


図14. 同調的に増殖している C. crescentus の γ 線照射(6krad)に対する感受性。

プレート選別法でスワーマー細胞の培養液を得て、これを30℃で振盪培養し、その生菌数(○)、及び6Kradの γ 線照射後の生存率(●)と測定した。図上部に C. crescentus の細胞周期と細胞型を図示した。

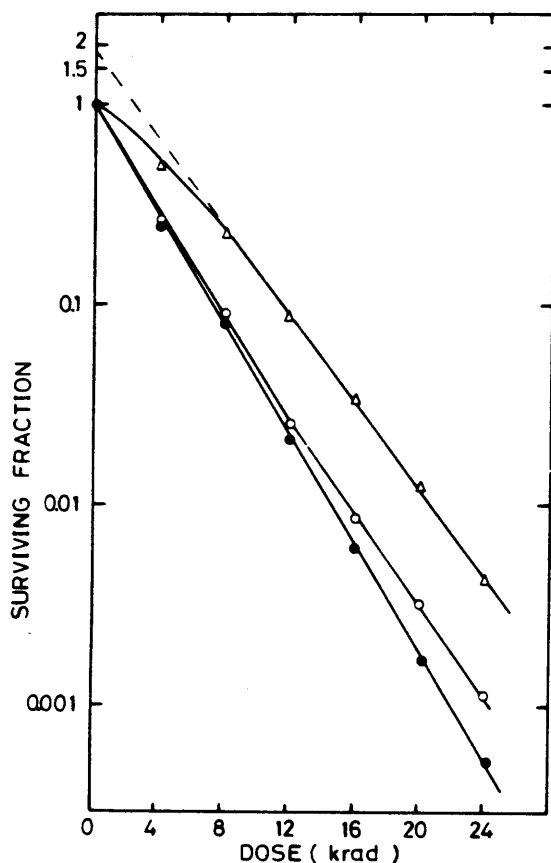


図15. C. crescentus の代表的な3種の細胞型の「線」に対する生存曲線。

C. crescentus CB13 のスワーマー細胞，ストック細胞，前分裂型細胞は，図14に示されたのと同様の同調培養液から，おのこの0分，30分，85分に分取して得た。それぞれの培養液には0°Cにおいて線量率2krad/分で「線」を照射しその生存曲線と求めた。

- スワーマー細胞
- ストック細胞
- Δ 前分裂型細胞

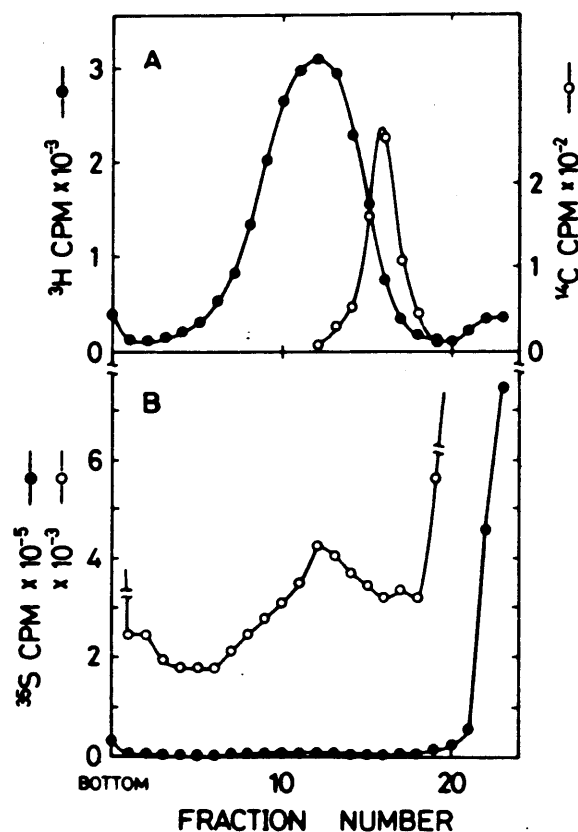


図16. C. crescentus 核様体のショ糖密度勾配遠心中での沈降パターン.

対数増殖をしている C. crescentus の溶菌液 0.5ml を42の方法に従って調製し, これを10-30%ショ糖密度勾配上に重層して17,000 rpm 50分間, 4°Cにおいて遠心した.

A 10時間にわたって ^3H チミジン(100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)で標識した対数増殖中の C. crescentus (●), 及び ^{14}C 標識されたT+粒子(○).

B 15分間 ^{35}S メチオニン(50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)でバ

ルスラベルされた対数増殖期にある C.
rescens (○, ●)。

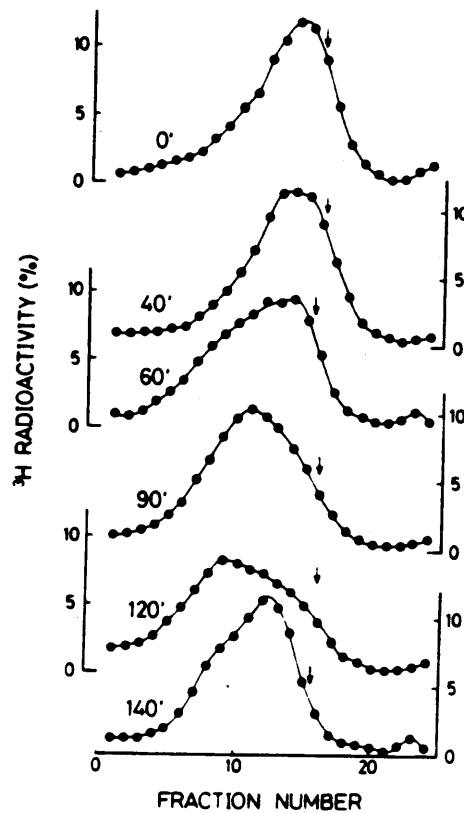


図17. *C. crescentus*の細胞周期中における核様体沈降パターンの変化。

4-2に述べた方法に従い、スワーマー細胞周期中の種々の細胞型を得る。これらは前回のS期において ^3H チミジンでDNAを標識されている。このおのおのの細胞型も同一条件で培養し、その核様体沈降パターンを分析した。縦軸は、全培養液に対する各フラクションの放射活性の百分率で示した。すべての細胞型において、遠心管底部から回収される放

射活性は10%未満であった。各曲線左の数字は、スワーマー細胞からの同調培養の時間(単位,分)であり、矢印は溶菌液に添加した¹⁴C T4 ファージのピーク部分を示す。

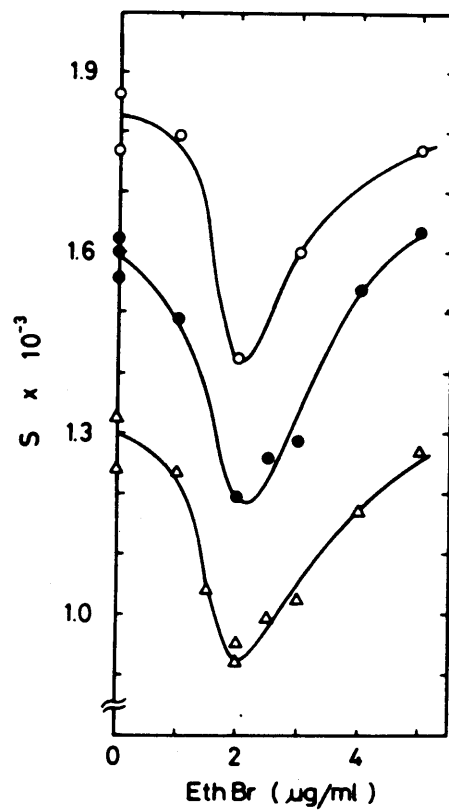


図18. 核様体の沈降速度に対するエチジウムブロマイドの効果。

対数増殖期にある *C. crescentus* を ^3H -チミジン ($200\mu\text{Ci/ml}$) で10時間標識した細胞(●), 及び10分間パルスラベルした細胞(○), さらに ^3H -チミジンで標識されたスワーマー細胞(Δ) の核様体の沈降速度を, 同じ遠心管内のセ-T4 フージの沈降速度から算定した。

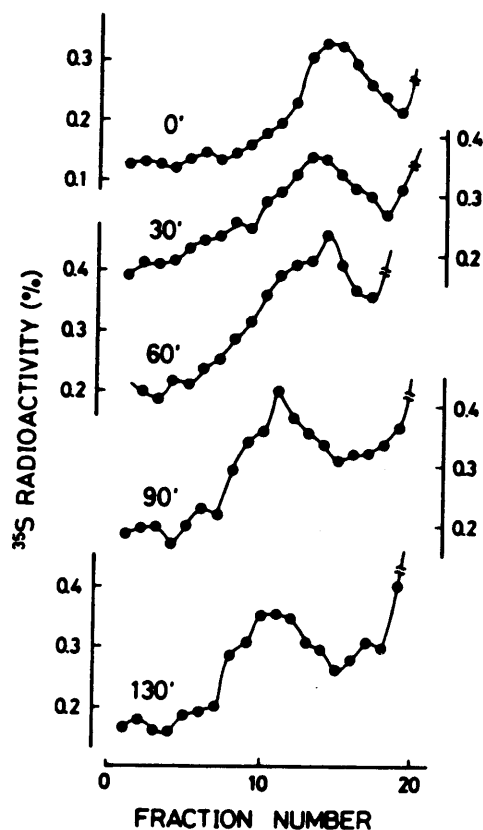


図19. C. crescentus の細胞周期中における核様体結合タンパク質の沈降パターンの変化。

プレート選別法により、スワーマー細胞周期における各種の細胞型を調製した。それぞれの細胞型につき、示された時間(単位、分)に溶菌を行なったが、その15分前より ^{35}S メチオニン($50\mu\text{Ci}/\text{ml}$)でタンパク質をパルスラベルしている。ショ糖密度勾配は図17と同様24フラクションに分画し、その核様体近傍のフラク

ションを、全溶菌液に対する各フラクションの百分率で示した。

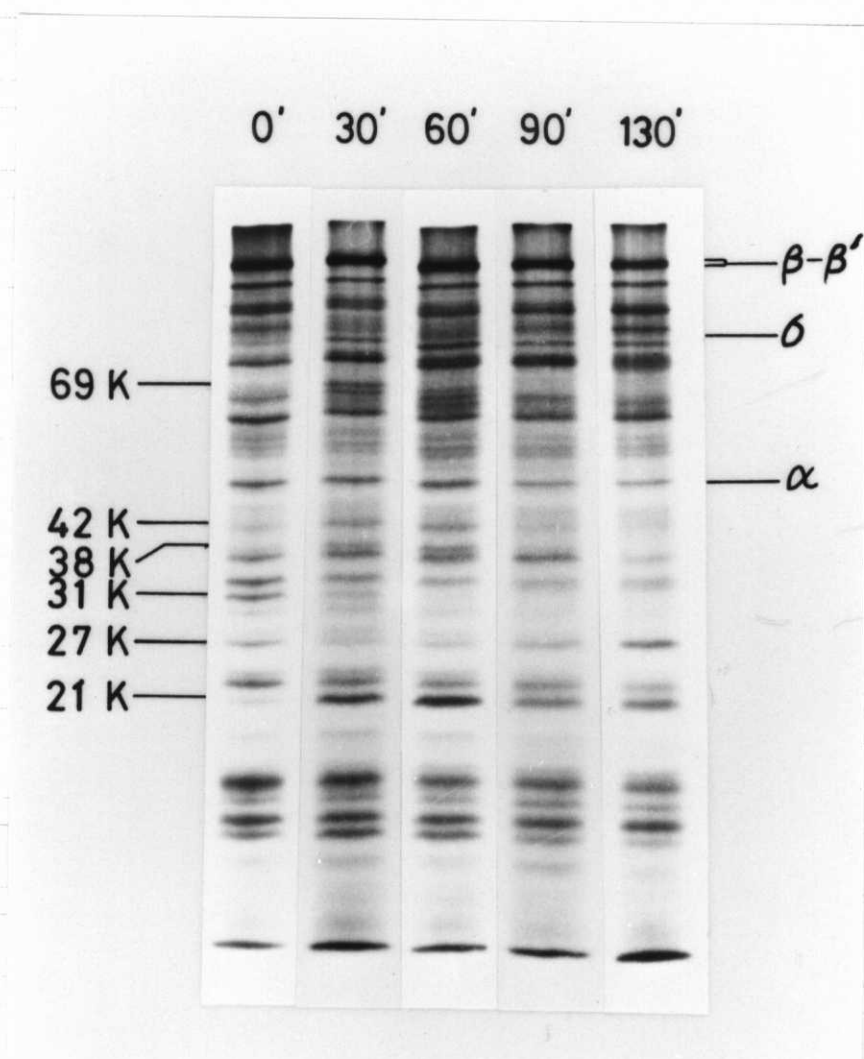


図20. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による核様体結合タンパク質種の細胞周期における変化の分析。

図19で調製した核様体結合タンパクのピーク(各6フラクション)部分を回収し, 12%の平板ゲルでそのタンパク種を分析した。