

ファージを用いた遺伝の実験（第3報）

筑波大学附属駒場中・高等学校

貝 沼 喜 兵

ファージを用いた遺伝の実験（第3報）

貝 沼 喜 兵

I はじめに

筆者は、枯草菌(*Bacillus subtilis*)を用いて「DNAは遺伝子の本体である」ことを実証する実験を高校「生物」あるいは「生物Ⅱ」に導入し、これを授業でどのように指導展開したらよいかの実践的研究を続けてきた。

これに加えて筆者は、ファージのもつ遺伝研究材料としてのすぐれた特徴を生物実験に生かせないかと考えていろいろな試みをしてきた。その結果、次にあげるような実験を生物Ⅱの授業に導入できることを実践的に確めた(第1報)。

1. rⅡ突然変異株の誘起。
2. Cis-trans 相補性テスト。
3. 三点実験による遺伝子地図作成。

遺伝学の発展につれて、「遺伝子概念」はどのように変遷してきたのだろうか。筆者は、その概念が提起されてくる基礎となった実験を、生徒に授業実験として指導することができないだろうかと考え、その実践的研究を試みた(第2報)。

ところで、明年から実施予定の選択生物の「遺伝子と形質発現」の項目で、「DNAが遺伝子の本体である」ことを証明した実験例として、多くの教科書は Griffith から Avery らにいたる肺炎双球菌の形質転換実験とならべて、1953年の Hershey と Chase の行なったT₂ファージを用いた実験例をあげている(図1)。

ファージを用いて明らかにされた分子遺伝学の成果は大変多い。当然ながら、その成果の一部は、選択生物などの教科書で紹介される機会も多くなるであろう。そうであるならば、指導する立場にある現場の教師として、ファージの教材化、ファージを用いた実験に関する実践研究の必要性が要請され

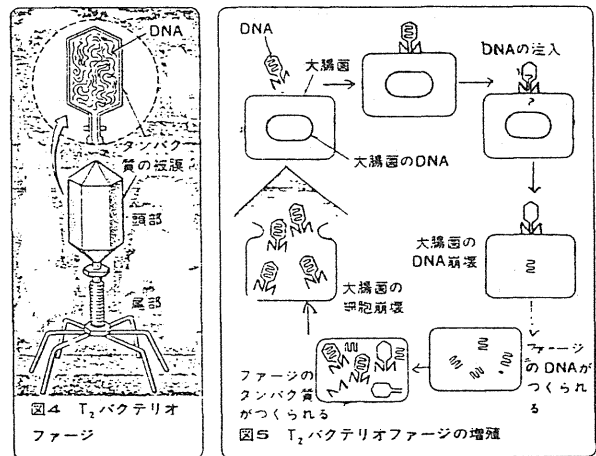


図1 G社の選択生物のT₂ファージの例

るのは当然の趨勢と考える。

Hershey と Chase の実験を例にとり、問題点を指摘してみると次のようなことがあげられる。ファージを取り扱った経験のない教師が、ファージについて全く知識のない生徒に、この実験を説明することはかなり困難ではなかろうか。

逆に、ファージの遺伝形質の区別を観察で理解し、あるいは、ファージの生活環を調べる実験を経験した生徒に、Hershey と Chase の実験を説明する場合は、教師は自信をもって指導できるのではないだろうか。

そこで筆者は、高校生物にファージの実験をすすめるという観点から次の 2 つについて実践を踏え問題提起を試みた。

1. はじめてファージ実験を導入する場合、どのような実験をどうすすめたらよいか。
2. ファージ実験の基礎を終え、より発展的な実験をめざす場合は、どのような実験をどうすすめたらよいか。

II ファージ実験の方法

1 ファージの遺伝形質

(1) 実験のねらい

ファージは、分子遺伝学の研究材料として最もすぐれたものの 1 つである。実験の手はじめは、ファージの遺伝形質とは何か、また、それほどどのように区別されるのだろうかを明らかにすることからはじめるとよいであろう。この実験は、同時にファージの定量法をも理解させることになる。

(2) 実験材料と準備(班単位に必要とする主なもの)

- ① 10^{-6} に希釈した T_4r^+ と rII の入った小試験管 ② 指示菌 (K12(λ) と BS) の入った小試験管
③ λ ボトム培地と λ トップ(滅菌したもの) ④ シャーレ 8 枚 ⑤ メスピペット
(10 ml 2 本, 1 ml 2 本, 0.2 ml 4 本)

(3) 実験方法

滅菌したシャーレに λ ボトム培地を分注し、冷却固化させる。これに Table 1 にしたがって指示菌を分注する。これを図 2 のように希釈したファージ液を 0.1 ml ずつ分注し、 λ トップを加えて

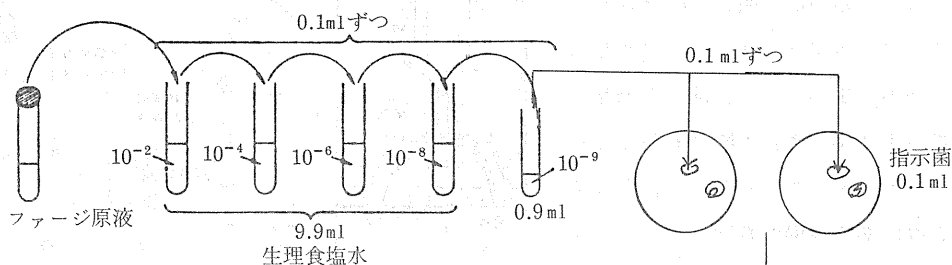


図 2 ファージの希釈とプレートの方法

ファージと指示菌を均一に分散固化させる。

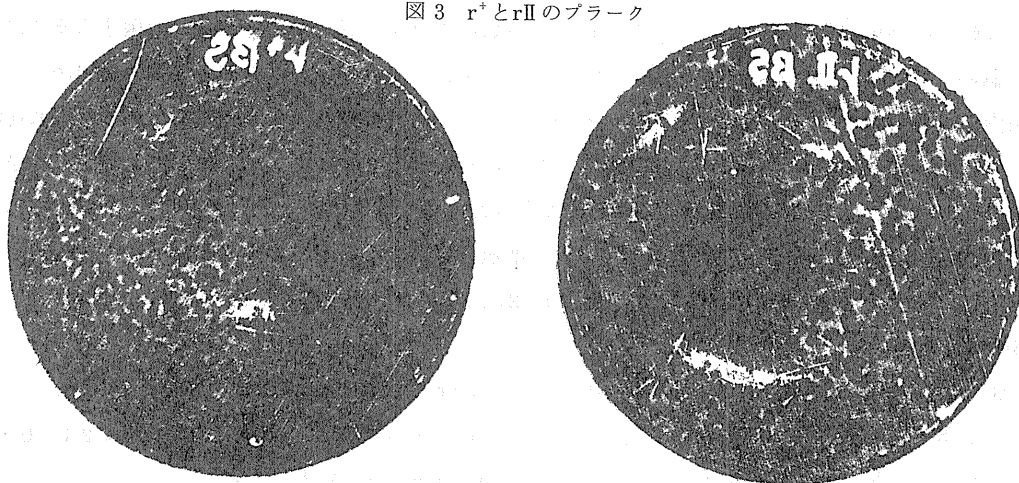
(4) 実験結果。

図3にあるプラークを測定し、結果をTable 1と2にまとめた。

ファージ 指示菌	K12(λ)		BS		ファージ/ml
T ₄ r ⁺ (wild)	46	39	35	43	4.1×10^{11}
T ₄ rII(mutant)	0	0	29	31	3.1×10^{11}

指示菌 ファージ	K 12(λ)	BS
T ₄ +	小型プラーク	小型プラーク
r II	プラーク形成 せず	大型プラーク

図3 r⁺とrIIのプラーク



(5) 結果の考察

r⁺は、K12(λ)とBSにプラークを形成し、BSに野性型のプラークを形成する。これに対し、rIIは、BSにr型のプラークを形成し、K12(λ)にはプラークを形成できない。電子顕微鏡でないと見ることのできないファージが感染、増殖、溶菌、そして再感染をくり返してできたものである。1個のプラークにはもとは1個のファージに由来した $10^7 \sim 10^8$ のファージ集団、すなわちクローンであり、バクテリアのコロニーと対応していることを生徒に理解させたい。また、この実験は次の生活環の解明へとつながっていく。

2 ファージの生活環(一段増殖)

(1) 実験のねらい

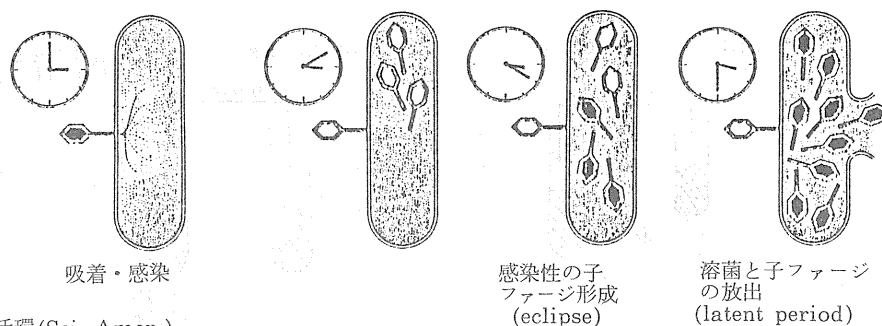


図4 ファージの生活環(Sci. Amer.)

大腸菌に感染したファージは図4のようにファージDNAを注入する。これが大腸菌内で複製をくり返し、子ファージをつくる。これまでの時間を暗黒期(edipse)といい、図4では20分で示される。つぎに子ファージが増加し、リゾチームを合成する。これによって大腸菌の細胞壁は溶菌され子ファージが放出される。この時間を潜伏期(latent period)といい、図4では30分である。このようにして放出される大腸菌1個当りの平均の子ファージ数と暗黒期ならびに潜伏期とを求め、ファージの生活環について理解を深めるのがこの実験のねらいである。同時にこれは、Hershey と Chase の実験を理解するのに直接的な実験となるであろう。

(2) 実験の原理

大腸菌に感染したファージが増殖し、菌内に多数の子ファージをつくっても、溶菌するまでは1個のプラークしかつukらない(A系列)。ところが、クロロフォルムを加えて溶菌を早めると、菌内につくられた子ファージは放出されるので、子ファージの数だけプラークを形成する(B系列)。このように、一定時間ごとにサンプリングしたものを、そのままλプレートにぬりつけたもの(A系列)と、クロロフォルムで溶菌してからぬりつけたもの(B系列)と分けてプラーク数を調べ、eclipse と latent period ならびに平均ファージ増殖数を求めることができる。

ここでのサンプリングの時間は、0, 7, 14, 21, 25, 30, 45, 60の8回である。

(3) 準備

- ① $3 \times 10^8 / \text{ml}$ E.coli BB ② 2×10^7 ファージ液(r^+ か r_{II} のいずれか) ③ 指示菌
- ④ λボトム, λトップ ⑤ シャーレ36枚 ⑥ メスピペット(10ml 2本, 1.0ml 2本, 0.2ml 30本) ⑦ 生理食塩水 9.9ml 11本, 0.9ml 4本, PB 5ml 1本。

(4) 実験方法

A系列, 時間(上記8回)ごとにサンプリングし, Table の希釈倍率にしたがって希釈し, λプレートにぬりつける。

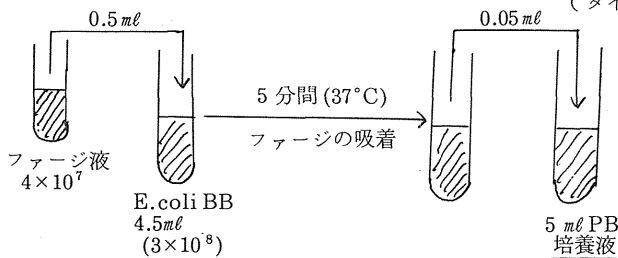
B系列, A系列の試験管にクロロホルムを加え, 60分放置した後, λプレートにぬりつける。A, B系列とも, 一晚培養した後プラークを測定し, データ処理をした後, グラフにかいて, eclipse や latent period などを求める。

方法を図5に示すと次の通りである。なお, この操作は, すべて 37°C の温湯を入れたビーカーで行なう。

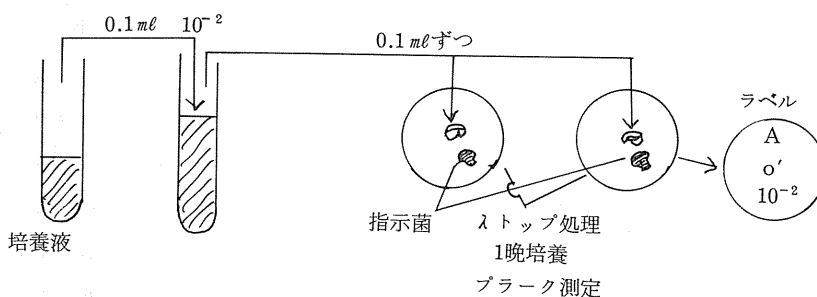
図5 ファージの生活環を調べる実験の方法

① BBにファージを接種する

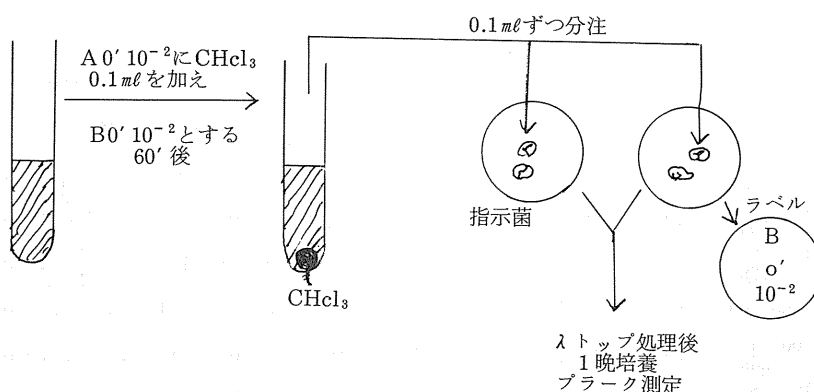
② 100倍に希釈しファージを増殖させる。
(タイム0とする)



③ A系列 $0' 10^{-2}$ のつくり方



④ B系列 $0' 10^{-2}$ のつくり方



実験結果

r^+ と $rII(638)$ とを比較して実験してみた。はじめに r^+ である。Table 3 のその 1 はプラークの記録である。Table 4 その 2 は、培養液中のファージ濃度の変化である。A 系列 0 分, $1 \times 10^4 / \text{ml}$ を 1 として A, B とともに比で示した。

これを片対数グラフにかき、グラフの立ち上りから eclipse と latent p. を求める。 r^+ の場合は 25 分 (eclipse), 35 分 (latent p.), 平均ファージ増殖数は 1 個の大腸菌あたり 230 個であった。

Tabel 3 ファージの生活環 r^+ その 1

タイム	A 系列		B 系列	
	dil	プラーク数	dil	プラーク数
0'	10^{-2}	6.14	10^{-2}	1.0
7'	10^{-2}	7.11	10^{-2}	1.1
14'	10^{-3}	0.6	10^{-3}	0.6
21'	10^{-3}	2.4	10^{-3}	3.4
25'	10^{-3}	5.8	10^{-4}	4.10
30'	10^{-4}	0.1	10^{-4}	1.7
45'	10^{-4}	11.11	10^{-4}	12.19
60'	10^{-4}	18.20	10^{-4}	31.42

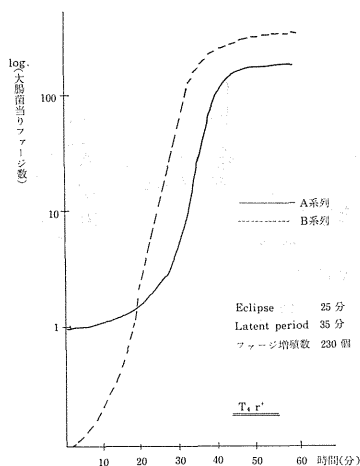


図5 r'の増加と潜伏

Table 5 ファージの生活環(rII) その1

タイム	A 系 列		B 系 列	
	dil	プラーク数	dil	プラーク数
0'	10^{-2}	$\frac{122 \times 4}{104 \times 4}$	10^{-2}	4 . 7
7'	10^{-2}	$\frac{114 \times 2}{126 \times 4}$	10^{-2}	21 . 30
14'	10^{-3}	56 . 69	10^{-3}	$\frac{173 \times 4}{174 \times 4}$
21'	10^{-3}	$\frac{200 \times 4}{259 \times 4}$	10^{-3}	$\frac{197 \times 8}{241 \times 8}$
25'	10^{-3}	$\frac{157 \times 8}{150 \times 8}$	10^{-4}	$\frac{131 \times 4}{160 \times 4}$
30'	10^{-4}	$\frac{147 \times 4}{163 \times 4}$	10^{-4}	$\frac{87 \times 4}{108 \times 4}$
45'	10^{-4}	$\frac{132 \times 4}{122 \times 4}$	10^{-4}	$\frac{118 \times 4}{165 \times 4}$
60'	10^{-4}	$\frac{200 \times 4}{211 \times 4}$	10^{-4}	$\frac{152 \times 4}{179 \times 4}$

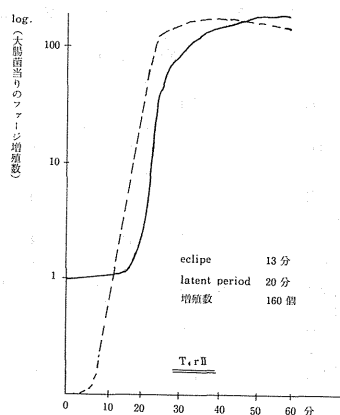


Table 4 ファージの生活環r⁺ その2

A 系 列			B 系 列		
タイム	ファージ濃度	比	タイム	ファージ濃度	比
0分	1.0×10^4	1	0分	0.05×10^4	0
7	0.9×10^4	0.9	7	0.1×10^4	0.1
14	3×10^4	3	14	3×10^4	3
21	3×10^4	3	21	3.5×10^4	3.5
25	6.5×10^4	6.5	25	7×10^5	70
30	5×10^4	5	30	4×10^5	40
45	1.1×10^6	110	45	1.5×10^6	150
60	1.9×10^6	190	60	3.6×10^6	360

Table 6 ファージの生活環(rII) その2

A 系 列			B 系 列		
タイム	ファージ濃度	比	タイム	ファージ濃度	比
0分	4.5×10^5	1	0分	5.1×10^3	0
7	5.4×10^5	1.2	7	2.5×10^4	0
14	6.3×10^5	1.4	14	1.3×10^6	2.9
21	9.2×10^6	20	21	1.7×10^7	38
25	1.3×10^7	28	25	5.8×10^7	128
30	6.2×10^7	137	30	3.9×10^7	87
45	5.1×10^7	113	45	5.7×10^7	127
60	8.2×10^7	182	60	6.6×10^7	147

rII(638)は、同様にして求めた eclipse は13分, latent p. は20分, ファージ増殖数は160個/大腸菌となった。rII 変異株のrは, rapid lysis, すなわち, 速溶菌性である。その特徴が, グラフから読みとれる。

筆者は, 生物IIの授業で, 生徒実験としてこの実験を取り上げている。その実験結果のグラフを参考にかかげてみた。問題点は, 生徒の技術的な障害で, グラフは必しもきれいでないが, eclipse, latent period, 平均ファージ数は読みとれる。

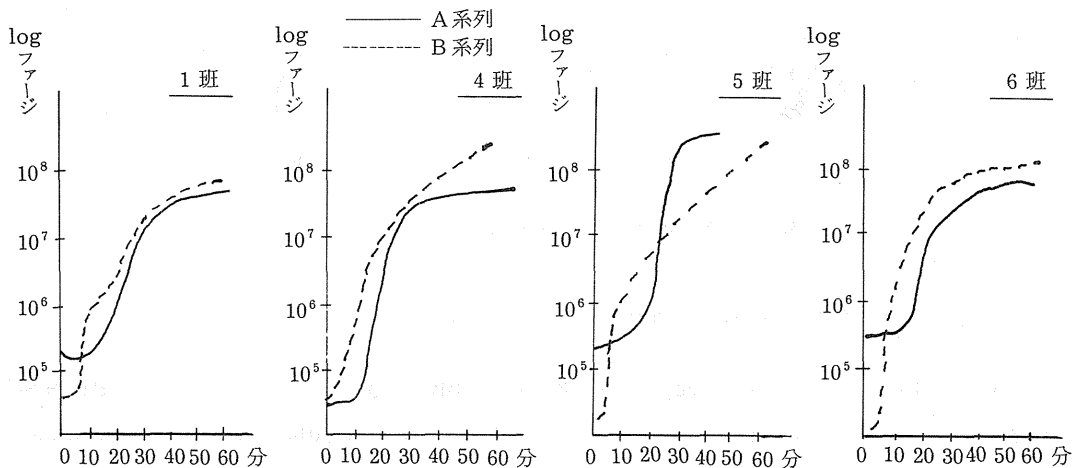


図7 生徒実験の結果

3 ファージ増殖数の変異幅を調べる実験（単個菌によるファージの産生）

(1) 実験のねらい

前の実験で得られたのは、大腸菌1個当たり平均のファージ増殖数であった。この実験では、平均ではなしに、個々の大腸菌のファージ産生数の変化を調べることにある。

(2) 実験原理および方法

大腸菌 BB ($3 \times 10^8 / \text{ml}$) に $2 \times 10^7 / \text{ml}$ のファージを接種する。5分間感染吸着後、これを 10^{-6} に希釈する。すると、ファージ濃度は、 $2 / \text{ml}$ になる。これを、小試験管に 0.3 ml ずつ分注する。すると小試験管1本当りのファージ濃度は $0.6 / \text{本}$ となる。このようにすると30本の小試験管では、18本がファージの感染を受け、12本がファージがないということになる。

この小試験管を90分 37°C で培養する。その後1本ずつ、別々の λ プレートに分注し、プラーク数を測定する。

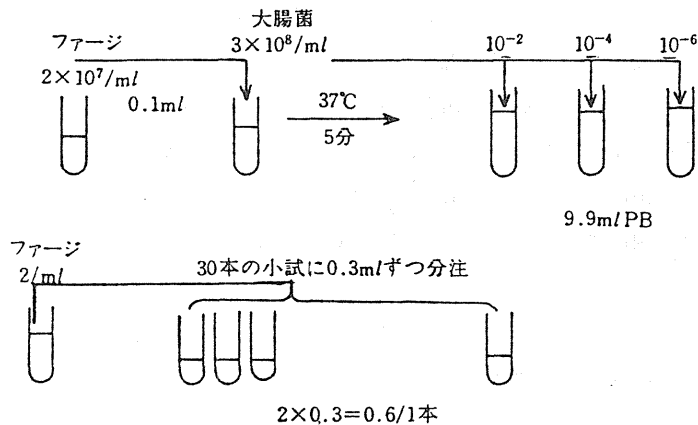
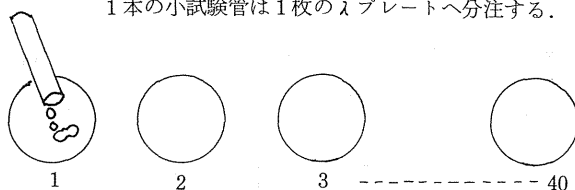


図8 実験原理

分注の方法

1本の小試験管は1枚のλプレートへ分注する。



λトップ処理後 37°C で1晩培養，ブラックを測定

図9 小試験管の培養液をλプレートへ分注

- (3) ① 2×10^7 のファージ (r^+ か rII) ② $3 \times 10^8 / ml$ BB ③ λボトム，λトップ，PB (9.9 ml 3本) ④ シャーレ 44枚 ⑤ 指示菌 ⑥ メスピペット (10 ml 2本, 1.0 ml 2本, 0.2 ml 6本)

(4) 実験結果と分析

Table 7 10^{-6} BB

25, 28	2.7×10^8
--------	-------------------

Table 8 10^{-5} r II

19, 23	2.1×10^7
--------	-------------------

- ブラック 0 …… 17枚 • ブラックあり …… 23枚

ブラック数 (数の少ない順にならべる)

11, 21, 25, 30, 37, 40, 48, 57, 57, 58, 60, 62, 69, 83, 108, 112, 125, 128, 200, 244, 464, 500, 636

○データの分析 (ポアソンの式による)

- a) ファージ濃度 2.1×10^7
 b) 試験管当りの感染菌数 $2.1 \times 0.3 = 0.63$
 c) 使用したプレート数 40
 d) ブラックのないプレート (計算値) $40 \times e^{-0.63} = 21.2$
 e) ブラックのないプレート (実測値) 17
 f) プレート当りの感染菌数 $\ln \frac{40}{17} = 0.86$
 g) 1個の感染菌より生じたブラックをもつプレート数 $40 \times 0.86 \times e^{-0.86} = 14.6$ 枚 (11~108)
 h) 2個の感染菌によるもの $40 \times \frac{0.86^2}{2} \times e^{-0.86} = 6.3$ 枚 (112~464)
 i) 3個の感染菌によるもの $40 \times \frac{0.86^3}{2 \times 3} \times e^{-0.86} = 2.3$ 枚 (500~636)

(5) 結果の考察

40枚のプレートについてポアソン式で分析してみた。ブラックのないプレートの理論値は，21枚であるが，実測値は17枚である。

1個の菌 (1個のファージの感染によると思われる) によると見られるものが，11個から108個となる。

この実験は、ファージを希釈して平均0.6個にするところにポイントがある。

Ⅲ ファージ教材化の検討

1. 高校生物実験への導入は無理か。

ファージ実験をすすめるのに必要な機器は次のようなものである。

冷蔵庫、恒温器(37°C)、オートクレーブ、乾熱滅菌器(150°C)、遠心分離器(4000r.p.m 4本がけ)。

これらの機器は、現在では、理科の教室では大体備えているように思われる。

ファージ材料は、大学の生物教室か、生化学の教室から分譲してもらえる。筆者は、東京大学医科学研究所の生物物理学教室から分けてもらった。

ファージ実験は、少し練習をつめば誰れにでもできる。筆者の学校の生徒実験の結果を見れば理解できると思う。筆者にとって、ショウジョウバエの交雑実験の方がはるかにはん難に思われる。

2. 生徒実験のすすめ方

この種の実験にかかわらず、生徒にすべての実験をやらせる必要はないし、また、そのようなことは実質的に不可能である。生徒にやらせる実験と、教師の準備することとのかかわりを実験項目ごとに私見を示したい。

また、授業は、一貫した長期的計画の中ですすすめるのであるが、1つの実験項目を例にとれば、大体次のパターンですすめている。なお、授業では、実験の原理、方法、結果のまとめ方などを書いたプリントをつくり、これを生徒に配布し、教材として使用している。

- ① はじめに実験のねらいと原理を説明する。
- ② 実験方法のポイントをプリントと黒板を併用して説明する。
- ③ 班単位(1班5～7名)に実験開始。状況に応じ実験を中止させ、生徒を集めて、筆者が重要な操作をやってみせるなどをし、生徒実験の失敗を防ぐ。
- ④ 実験終了後は、結果の観察、レポートのまとめ方などを注意して授業を終る。

(1) ファージの遺伝形質

○教師の準備するもの。

- ① ファージ原液。これは教師が準備する。必要に応じて、培養するのはもちろんのこと、適当に希釈し小試験管に分注し、班の数だけ準備しておくといよい。
- ② 指示菌。ファージ液と同様に教師の方であらかじめ培養し、小試験管に分注して配布するといよい。
- ③ 培地や生理的食塩水など。培地の調整と滅菌などは教師の方で準備する。班の数だけ準備するのがポイントの1つである。
- ④ シャーレとメスピペットなど。シャーレの洗じょうと風乾は生徒にやらせる。メスピペッ

トはピペット洗じょう器で水洗いし、これを乾熱滅菌するのは教師側である。

なお、これは、実験助手のいない筆者の学校のケースであるが、実験助手がいるところは、また、いろいろとその学校の実情に応じた対応ができるであろう。

○生徒実験の実際

- ① シャーレに λ ボトムを分注し λ プレートをつくる。
 - ② ファージ液の希釈 ($10^{-6} \rightarrow 10^{-8}$)。
 - ③ λ プレートに指示菌を分注し、これに 10^{-8} に希釈したファージ液を 0.1ml ずつ分注する。
 λ トップ処理をする。
 - ④ 恒温器に入れて一晩培養する。
 - ⑤ 翌日の昼休みか放課後、プラークを観察し、記録する。
 - ⑥ シャーレの寒天を処理し、シャーレを水洗いし風乾させる。
- (2) ファージの生活環

ファージの遺伝形質を調べる実験と基本的に同じである。教師は、E.coli BB を生徒実験の前に調整、小試験管に分注しておく。ファージ液も同様である。

生徒実験は、 λ プレートが調整できたら、教師の準備した大腸菌とファージを用いて A 系列と B 系列のプレートを調整する。

これを一晩培養し、翌日取り出してプラークを測定記録する。結果の分析は班単位に行なわせ、レポートは各自でまとめ提出させる。

(3) ファージ増殖数の変動を調べる実験

生活環を調べる実験と同じ要領ですすめる。

生徒は、一定に希釈したファージと大腸菌を教師から受けとる。E.coli BB にファージを接種し、希釈し、小試験管に 0.3ml ずつ分注し、60分培養後、 λ プレート処理し、 37°C で 1 晩培養する。結果の観察と後片づけは前の実験と同様である。

3. 発展した実験

ファージ実験の基礎が終了したら、より発展的な実験をすすめたい。次のような一連の実験が一貫性があり極めて興味深い指導ができる。

(1) 亜硝酸処理による rII 変異株の分離

r^{+} を NaNO_2 液中で処理し、これを BS を指示菌とし、 λ プレートにぬりつけて r プラークを拾う実験である。1 クラス 6 ケ班で合計 60~100 枚の λ プレートから 6~10 株の rII 変異株を分離できる可能性がある。この実験で、遺伝研究における変異株分離の役割などを指導することができる。また、この実験を通して muton の概念について考察させることができる。

(2) シストランス相補性テスト

分離した rII 変異株を培養し、これを材料にしてシストランス相補性テストで A、B のどのシストロンに欠陥を生じた株かを確定することができる。この実験を通して、cistron とは何か

を指導することができる。

(3) 遺伝子地図作成

この実験は分離した変異株を3株用い、三点交雑法で、組みかえ率の大小を比較し、突然変異の生じた部位の相対的位置をきめる実験である。この原理は、ショウジョウバエなどで染色体地図を作成するのと全く同じである。しかし、ファージの場合は、操作ははるかに簡単で、しかも、短時間に、大量の個体数を取り扱うので古典遺伝学の時代には想像できなかった詳細な遺伝子分析ができ、「recon」という新しい概念が提起されてきた。この実験のねらいは、1つは recon の概念が、誰れにより、どのような実験を通して提起されてきたのかを指導することにもある。

これら3つの実験は、相互に密接に関連し合っている。これらの実験を通して生徒に一体何を指導できるのだろうか。それは、次のような諸点ではないだろうか。

1. 遺伝子概念の具体的指導、分子遺伝学の遺伝子概念を、それが提起された実験を生徒に経験させながら具体的に指導できることである。

2. ユニークな実験原理・方法、それぞれの実験は、ファージ実験独特の原理と方法が随所にみられ、生徒も感激させられる。科学を発展させてきたのは、粘り強い努力もさることながら発想のユニークさやアイデアにある。これを生徒に体験させることができる。

3. データの分析。実験結果、得られたデータが信頼できるか否を検討することは科学する場合の必須の条件である。ファージ実験は、この点で極めてすぐれている。このようにして、得られたデータから一定の法則性を導びき出すことを生徒に経験させることができると考えている。

終りに、この論文をまとめるにあたり、ファージブランクなどの特殊な撮影は、写真家の金子昇一氏に撮って頂いた。ここにその事実を記し、深く感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 植竹久雄他編(1967): 微生物遺伝学: 朝倉書店
- 2) 富沢純一(1970): バクテリオファージの実験: 岩波書店
- 3) G.S. ステント 三宅端訳: バクテリオファージ: 岩波書店
- 4) 梨本裕子: 内田久雄(1966): ファージ実験法1~7: 蛋白質・核酸・酵素: 共立出版: Vol.11 No.1~7
- 5) Benzer(1968): The Molecular Basis of Life Sci.: Amer. Freeman
- 6) 貝沼喜兵(1971): ファージを用いた分子遺伝学の実験(1)~(4): 遺伝 Vol.25 No.7~10: 裳華房