

Frederic L. Holmes 著 "Meselson, Stahl and the Replication of DNA" (Yale University Press, 2001) を数回にわたって 2003 年から 2004 年にかけて AUC フォーラムに紹介しました。

序章

- 1 章 The Replication Problem
- 2 章 Meselson and Stahl
- 3 章 Twists and Turns
- 4 章 Crossing Fields
- 5 章 Dense Solution
- 6 章 The Big Machine
- 7 章 Working at High Speed
- 8 章 The Unseen Band
- 9 章 One Discovery, Three Stories
- 10 章 Extremely Beautiful Experiment
- 11 章 Centrifugal Forces
- 12 章 The Subunits of Semiconservative Replication
- 13 章 Image of an Experiment
- 14 章 Afterward

Meselson & Stahl の実験の経緯

1. メセルソンとスタールの出会い

メセルソン (Matthew Meselson, 1930-) は 1946 年シカゴ大学に入学したが、紆余曲折の後、1950 年にカリフォルニア工科大学 (以下、カルテク) の化学科に再入学した。ここでポーリングの化学結合論の講義を聞いたことが最終的に将来の方向を決定したようだ。しかし、1 年後にはシカゴ大学で化学のコースを終えるために再びシカゴに戻り、1952 年シカゴ大学のコースを修了した。メセルソンはバークレーの大学院生物物理学コースに惹かれて、バークレーを訪れたが、コースはまだ始まっていなかった。1 年間物理学科でフリーマン・ダイソンの講義などを聴いて物理学を学んだメセルソンは、化学・物理を基礎にして生物学をやりたいと考え、学科主任に相談したところ、ポーリングのところへ行くように勧められた。ポーリングは当時既に高名な科学者 (1954 年ノーベル化学賞) で、自分はとても取ってもらえないだろうと思ったメセルソンは、シカゴ大学の数理生物学研究科に行こうと考えた。しかし、1953 年の夏、パサデナで、ポーリングの息子で友人のピーター・ポーリングの主催した水泳パーティーに参加し、そこでポーリングに直接会い、ポーリングから数理生物学をや

るよりも自分のところに来たらどうだと言われてその場でポーリングの研究室に行くことを決めた。

ポーリングから与えられた課題はテリウムの結晶構造解析だったが、生物に興味があるので、有機化合物がやりたいと言ったところ、それではということで、N,N'-ジメチルマロンアミドの構造を解くことになった。この化合物はポーリングが関心を持っていたペプチド結合を持っており、特にその部分の構造決定が目的だった。ポーリングは既に彼の共鳴理論に基づいてペプチド結合に関わる6つの原子が同一平面上にあるという結果を出し、それを実験的に検証しようとしていた。当時、カルテクにはファインマン（朝永振一郎・シュウィンガーと共にノーベル物理学賞受賞）もいて、メセルソンは彼の物理学の講義も聴いている。メセルソンの博士論文審査員の中にファインマンが加わっているのは、これがきっかけになったと思われる。

1954年、モノー（Jacque L. Monod, 1910-1976）がパサデナでβガラクトシダーゼを中心とした誘導酵素に関する講演を行った。この講演を聴いたとき、メセルソンは酵素が誘導されているかどうかを調べるには重水を用いて重水素を取り込ませて密度の違いで新たに酵素が誘導されているか見るのがいいのではないかと考えたという。こういうことを思いついたきっかけになったのはポーリングの講義を聴いて、水素が重水素に置き換わったときの水素結合の強さの変化を計算することなどを考えていたためらしい。モノーの講演の後、バクテリアが重水中でも増殖するという論文を読んで興奮したメセルソンは、ポーリングにその話をして、モノーの仕事を重水を使って証明する実験をやりたいと行ったところ、ポーリングはそれはおもしろいが、まず今の仕事を片づけてからにしろ、と言ったという。メセルソンはこの間、パサデナの自由な雰囲気の中でファージグループとも親交を持ち、次第に才能を認められていった。

1953年から54年にかけて、メセルソンはパサデナでJ. ワトソンと同じ宿舎に住んでいた。1954年の夏のウッズホールの夏の学校の生理学コース（Physiology Course）で講師を引き受けていたワトソンは、以前から優秀だと知らんでいたメセルソンに目をつけて講習会の助手として働かないかと持ちかけたところ、メセルソンは承諾して6月1日にウッズホールに向かった。メセルソンはそこでスタールに会うことになる。

一方、スタール（Franklin W. Stahl, 1929- ）は1947年にハーバード大学に入学して、生物学を専攻し、1951年に卒業してロチェスター大学の大学院に入学した。3つの大学院を受験して、ここが唯一合格したところだからである。指導教官のチャールズ（Donald R. Charles）は細胞学が専門だったが、スタールは1952年にCold Spring Harborでドウアマン（A.H. (Gus) Doermann）のバクテリオファージの講義を聴いてからバクテリオファージの遺伝学に惹かれ、バクテリオファージの研究に転向したいと考えていた。折からドウアマンが新しいスタッフメンバーとしてロチェスターに着任することになり、スタールは彼のグループに加わることになった。（*ドウアマンはデルブリュックらによって開発

されたファージの一段増殖法を拡張して、経時的に人工的に感染菌を溶菌させ、ファージの数を測定をすることによって、感染後数分間大腸菌内に感染性のファージが見られない時期（暗黒期）があることを明らかにしたことで著名。）

ドウアマンの下で、スタールは ^{32}P を取り込ませたファージの不活性化と多重感染による再活性化の関係から複製の仕組みを理解したいと考えた。スタールはドウアマンと自分自身のファージの不活性化と再活性化の実験結果を説明するための理論式を導こうとしていた。ウッズホールの夏の学校の生理学コースに参加したのは丁度このときで、スタールは既に頭角を現していて、ワトソンは彼のことを知っていた。ハーシー・チェイスのブレンダー実験（ブレンダーはミキサーのこと）後、 ^{32}P を使って複製の実験に取り組んでいたのは、ドウアマン、スタールの他にステントがいた。ステントはバークレーで同様な実験を行っていた。なお、当時はファージの遺伝子についてはほとんど何も知られておらず、遺伝マーカー（表現型）としては大きなプラークを作る数種の r（rapid lysis）、小さなプラークを作る m（minute plaque）、および濁ったプラークを生じる t（turbid plaque）が知られていただけで、ドウアマンはこれらの遺伝マーカーをいくつかの連鎖群に分類していた。

メセルソンはワトソンの実験助手として参加していたが、コースに参加していたスタールの噂を聞き、機会を捉えてスタールに会うことができた。スタールはメセルソンに自分が導こうとしていた理論式について説明したところ、メセルソンは数日後、結果を携えてスタールに再び会うことになった。お互いの才能を認め、意気投合した。メセルソンは密度の違いで DNA を分離することによって DNA の複製の仕組みを明らかにするという自分のアイディアを語った。その材料としてスタールの使っているファージ DNA を使うことになったのは自然の成り行きだった。スタールは学位を取った後は当時のファージ遺伝学のメッカであったカルテクに行きたいと考えていたので、近い将来にメセルソンと共同研究をしようとして約束した。いずれにしても、当面ふたりはそれぞれの学位の取得のための実験に専念しなければならなかった。もう一人、ファージグループに加わる予定になっていたポストドクに Jan Drake がいた。三人はパサデナでの再会を誓った。

（以上、1 回目）

2. パサデナでの再会

1955年夏に学位を取得したスタールは、ロックフェラー財団の奨学金を得てポストドクとしてパサデナのカルテクに向かった。当時のカルテクの化学部門にはライナス・ポーリング、生物学部門にはマックス・デルブリュックがいて、生物学部門はファージ研究のメッカだった。

スタールがパサデナに到着してしばらく後、メセルソンとジャン・ドレークはスタールを誘って三人でカルテクが所有していたサン・パスカル通りの大きな家で共同生活をするようになった。メセルソンは料理、スタールは皿洗い、ジャン・ドレークは家の内外の掃除を受け持った。

メセルソンとスタールはパサデナで合流はしたものの、すぐに共同研究を開始する体勢にはなかった。スタールのボスは Bertani で、スタールを独立した研究者

と見なしたが、バクテリアの遺伝学を学ばせるために、スタールに大腸菌C株から雄株 (F+) を単離するよう要請した。スタールはその仕事に取り組む傍ら、学位論文を投稿論文にするために書き直していた。

スタールが投稿論文の仕上げに専念している一方、メセルソンは N,N'dimethylmalonamide の構造決定を続けていた。構造決定は時間のかかる作業だったが、X線回折のデータを満足するモデルの構築、モデルから計算されるX線回折との相違の検討、モデルの再構築、という過程を繰り返していた。

この間、レヴィンタール、ステントらがそれぞれの複製モデルを提出していたが、当時の状況としてはワトソン・クリックの複製モデルは必ずしも厳密に証明されたものではなかったし、ドナヒュー (Donohue) のように厳密な構造化学の立場からは可能な別の塩基対の構造もいくつか提出されていた。メセルソンは実験の合間にスタールとの共同研究の対象になるDNAの塩基の構造化学についての知識を深め、ドナヒューの提出していた可能な塩基のペアーの構造を検討したが、ワトソン・クリックのモデルは“捨てるにはあまりにも美しいモデル”であった。

3. 共同研究までの道のり

メセルソンとスタールの共同研究は一直線には開始されなかった。メセルソンが N,N'dimethylmalonamide の構造決定を終えて塩基の構造化学の文献調査によって塩基対合の特異性について考察を深めていた頃、スタールはバークレーからの招聘に心を動かされていた。メセルソンと違って必ずしも才能に自信を持ってまっしぐらに進むというタイプではなかったスタールはパサデナのフェアジグループで高く評価されていたにもかかわらず、与えられたF+株の分離もうまくいかず、鬱々とした日々を過ごし、将来の別の方向を考え始めていた。スタールはミシガンからの招聘を丁重に断った上で、一旦バークレーへの就職を決意した。

メセルソンはスタールがバークレーへの招聘を受諾して間もない1956年の9月下旬にスタールを尋ね、自分がやっと N,N'dimethylmalonamide の構造決定の仕事を終えたこと、これからやっと念願の2人のDNA複製機構解明の仕事に取りかけられることを報告した。スタールがバークレーへの転出を決意したことを知ったメセルソンは、この仕事がうまくいくためには、スタールの協力が必須であること、カルテクにはワイグル (Jean Weigle, 物理学から生物学へ転向、フェアジをやっていた) やデルブリュックもいてこんな理想的な環境はないことを述べた。ワイグルやデルブリュックもスタールにここに留まるべきだと説いた。その結果、スタールは一旦承諾したバークレーへの転出を諦めてカルテクに留まることにした。バークレーのレヴィンタールやステントは当然ながらメセルソン達がスタールを説得して留まらせたことに怒りを表明した。なお、スタールは Bertani から与えられた課題がうまくいかず、これも彼の気分を低下させていた一因だったが、このときになって初めて実験の初歩的な誤り (試験管のラベルの貼り間違い) に気づき、それから簡単にF+株を単離することができた。

(以上、2回目)

4. 共同研究の始まり

ウッズホールの中からふたりが目をつけていたのは5ブロモウラシルだった。既に、大腸菌DNAのチミンを5ブロモウラシルで置き換えることができることが報告され、そのうちにT2ファージのDNAを5ブロモウラシルで置き換えることもできることが報告された。5ブロモウラシルの変異原性を構造的な立場から解明することもふたりが当初から関心を持っていた問題だった。こうして、必然的にDNAの材料としてはT4ファージ、密度標識には5ブロモウラシルが用いられることになった。

しかし、メセルソンは初めから超遠心分析で5ブロモウラシルを含むDNAと含まないDNAが分離できることを確信していたわけではなく、一時は電気泳動法に切り替えようかと考えていた。ひとつには、5ブロモウラシル置換DNAと非置換DNAを密度の違いで分離する実験からそれほどクリアーカットな結果が得られるかどうか不明だったこと、メセルソンは変異のメカニズムを考える過程で5ブロモウラシルとチミンのpKの違いに注目していたこと、また、丁度その頃チセリウスのところから新しい電気泳動法の開発を行っている研究者がカルテクを訪れたこと、などの要因があった。

メセルソンが参考にした本にフランク・W・プトナム (Frank W. Putnam) の“*Ultracentrifugation of Bacterial Viruses*”と“*Molecular Kinetic and Electrophoretic Properties of Bacteriophages*”があった。前者には、T1ファージからT7ファージまでの7種類のファージの大きさ、形、分子量、偏比容が記載されていた。メセルソンが特に注目したのは偏比容だった。超遠心分析か電気泳動かと考えていたメセルソンは1951年からポーリングのグループに加わっていた超遠心分析の専門家のジェローム・ヴィノグラード (Jerome Vinograd) に相談した。ヴィノグラードは独立に実験していたが、機器分析の実験の相談に乗る役割も科せられていた。彼の管理していた実験室は、地下にあって生体高分子を研究するための新しい装置を集めており、移動界面電気泳動の装置 (チセリウスの電気泳動装置) や新しい超遠心分析機 (ベックマン Model E) が設置してあった。(Model Eの第1号機は1947年にバークレーのウイルス学研究所に設置されている。)

ヴィノグラードによれば、(DNAなら)濃度としては0.002% (0.02 mg/mL) まで検出可能であること、沈降係数の違いとしては1.5:1なら問題なく分離でき、1.1:1でも分離できるかもしれない、ということであった。しかし、肝心のことが分かっていなかった。チミンを5BUに置き換えることによって、ファージの密度はどの程度変わるのだろうか。そこで、メセルソンはT4ファージのDNAのチミンをすべて5BUまたは5IU (ヨードウラシル) に100%置き換えるとファージの密度はどの程度変化するかを計算し、5BUなら3%増加、5IUなら5%増加すると期待した。そして、この場合、ファージの大きさ形は同一なので、沈降係数はこの割合で増加すると考えられた。この値はヴィノグラードが言う分離可能な違いの高々3分の1にしか過ぎなかった。しかし、メセルソン達は沈降係数の違いで分けようとは思っていなかった。即ち、チミンを含むDNAと5BUで置換したDNAの中間の密度の溶媒を使うことだった。

メセルソンはプトナムの求めたファージの偏比容の逆数としてファージの密度は 1.51 g/mL と見積もった。粒子の沈降係数は下記の式で求められる：

$$s = \frac{M(1-v\rho)}{f}$$

5 BUで置換されたファージの密度は 1.51x1.03 となる。従って、 $s'/s = 2$ になるようにするには溶媒の密度 $\rho = 1.47$ mg/mL にすればよいことになる。このとき、沈降係数は 0.5 となり、沈降実験には5時間程度かかると見積もられた。

このような計算をする中で、メセルソンは沈降係数の違いによって分けるのではなくて、片方の粒子は浮き、もう片方の粒子は沈むような条件で分けなければいいだろうと考えていた。メセルソンはそのための高密度条件を作ることのできる塩を探した。Handbook of Chemistry and Physics には適当な塩がなかったので、International Critical Tables of Numerical Data を調べたところ、20°Cで密度が 1.6 から 2.0 になるような塩が載っていた。Ba(ClO₄)₂, RbCl などが候補になったが、2価のカチオンはDNAと蛋白質を架橋する可能性があるとして排除し、CsCl (20°Cで密度 1.9095) がよさそうだ、ということになった。メセルソンは化合物名、密度の他、粘度、屈折率などを克明にメモしている。はじめ CsCl がなくて注文してくるまで RbCl を使ってみたがうまくいかなかった。この頃、メセルソンはバークレーにシャハマン (Howard Schachman) を尋ね、RbCl よりも CsClの方がずっとよいことを聞いた。業者から CsCl が届く前に、バークレーから CsCl を分けてもらったようだ。一方、スタールの方は、5 BUをさらに高度に含んだファージの調製に成功していた。そこで、彼らはまず、レナート・ダルベッコ (Renato Dulbecco) の研究室にあった調製用の超遠心機 (Spinco Model L) を借り、T 4 ファージより重い密度の溶液とファージを混ぜて遠心すると、確かにファージがチューブの上部に浮遊してくることを確認できた。(各画分のファージの濃度はブランクアッセイによって決定した。)

(以上、3回目)

5. 超遠心分析機での実験の開始

カルテクには1947年に組み立てられたホームメイドの超遠心分析機があったが、しばしば不調で、メセルソンとスタールがカルテクで実験を始めた頃にはほとんど使われていなかった。これに替わって、1956年に Spinco の Model E が設置され、ヴィノグラードが管理していた。メセルソンもT 4 ファージを材料にしたこの機械の最初の沈降速度法の実験に参加している。

メセルソンは屈折率を測定して比重 1.6022 のファージ・CsCl 混合液 (21.3°C) を用意した。ファージ自体の密度は 1.51 とあらかじめ調べてあった。ファージ濃度は 8.3×10^{11} (pfu = plaque forming unit) で、DNA 濃度で 0.02 %であった。回転数は 52,640 にセットした (Model E では回転数は連続的には変えられず、決まった飛び飛びの値でしか回せなかった)。測定はシュリーレン光学系で行った (現

在のベックマンコールターXL-A/Iにはシュリーレン光学系はない)。2時間15分かかって沈降境界面は期待通り、底からメニスカスまで通常と逆方向に浮揚した。実験は、ファージが完全に一様であることを示していた。(センターピースはシュリーレンもUV光学系もシングルセクターセルが用いられた。使われたローターはAn-Dローターと呼ばれるもので、ラグビー球のような形で、1回に試料はひとつしか測定できない。UV光学系では写真を撮るには現在のように受光部を半径方向にスキャンするのではなく、シャッターを短時間開け放つだけであった。セルはひとつしかなく、もう片一方はカウンターバランスを入れるので、こうすることでセル内の濃度分布が記録される。乾板はその都度、又はまとめて何枚か現像された。)

この実験の間、メセルソンはシュリーレンのベースラインが次第に上がっていくことに気づいていた。何かが起こっている、と直感した。塩化セシウムが沈降していたのである。メセルソンはスベドベリーの共同研究者だったカイ・ペーダーソン(Kai Pederson)の1934年の論文を読み直してみた。ペーダーソンは7種類の塩類の超遠心を行っていて7-10時間の間に、ある濃度勾配で平衡に達した、とドイツ語で報告していた。メセルソンはこのような低分子が沈降平衡に達するには何日もかかるだろうと思っていたので、驚いた(注:今から考えるとそれほど驚くべきことではないかもしれない。拡散係数が大きいほど平衡に達するのは速いはずだ。論文中のStundenという言葉が「時間」以外の単位を意味することがないかどうか、確認のためにデルブリュックに聞きに言ったそうである)。まさに、メセルソンは塩化セシウムの濃度勾配の形成を見ていたのであったが、信じられない思いだった。

ちょっと考えると、これは新しい可能性が出てきたわけで大変喜ぶべき発見のように思えるが、メセルソンは当初、むしろ自分たちの計画がうまくいかなくなるかもしれないと心配した。即ち、濃度勾配が形成されると、重い方のDNAは底まで行かなくなり、軽い方のDNAはメニスカスまで動かなくなり、もしDNAが拡散のために拡がったりすると、このために2種の分子が別れなくなるかもしれないと思ったからだ。そうってしまったら、電気泳動に切り替えるしかないだろう、とメセルソンは考えていた。しかし、後から見るように、これは杞憂だった。(以上、4回目)

6. 超遠心分析の続き

二回目の実験では平衡法を行ったが、途中で液漏れがあって実験は中止された。次の実験では $2.2 \times 10^{11}/\text{ml}$ のファージ溶液を用い、CsCl溶液の密度はファージの密度に近い1.516を用いた。液漏れを防ぐために、回転速度は低めに抑えて25,980 rpmとした。この実験ではUV光学系が主に用いられた。40時間後、セルの内側と外側に2つの幅広いバンドが見られた。ファージは一部壊れていくように見えた。

次の実験ではファージ濃度は $0.6 \times 10^{11}/\text{ml}$ を用い、CsClの密度は1.4900を用いた。濃度は回転数は同じく25,980を用いた。ファージの崩壊を防ぐために少量

の MgSO_4 が加えられた。この実験は原因不明でうまくいかず、5時間後に中止してすぐに次の実験に取りかかった。今度は濃度は前回、前々回の間値 $1.2 \times 10^{11}/\text{ml}$ とし、 CsCl 溶液の密度は少し重い 1.4775 とした。回転速度は同じで丸2日続けられた。この実験結果は明瞭で、真ん中付近に広いバンドが生じ、底近くに薄い細いバンドが見えた。メセルソンとスタールはこの乾板をが Spenco 社が販売していた光度計でスキャンして縦軸に濃度を取ってプロットすることができた。

なお、当時市販の CsCl は UV 吸収のある混入物があり、精製して使う必要があった。2人はセシウムを過塩素酸塩として沈殿させ、これを洗って可溶性の不純物を除いた後加熱して過塩素酸を分解することによって純粋な CsCl を得た。底近くに生じたバンドが DNA であることを確認するために、メセルソンは同じ条件で子ウシ胸腺 DNA の遠心を行った。結果はこれを裏付けた。さらに、彼らは T4 フェージに浸透圧ショックにかける（塩化セシウムで平衡化したフェージを注射器を使って攪拌しながら水中に注入すると、頭が破れて DNA が外に出る）ことによって DNA を調製し、さらに最初の実験のバンドの位置を確認した。他方、スタールはフェージの変異の遺伝学に取り組んでいたが、5BU を取り込ませたフェージの X線による変異生成率が上昇することに注目していた。スタールの 5BU を取り込ませた DNA の超遠心分析による分離の実験も間近に迫ってきた。

7. T4 フェージ DNA の超遠心

1956年12月クリスマス休暇に入り、超遠心分析機が自由に使えるようになっていよいよ T4 フェージ DNA の遠心の実験に入った。フェージ粒子よりも DNA の方がシャープなバンドを形成したし、目指していた T4 DNA と 5BU 置換 T4 DNA を分離するには蛋白質のない DNA の方が密度差は当然大きく出るのはずだった。メセルソンはシンスハイマー (Robert Sinsheimer) からもらった高濃度のフェージ溶液からフェージを精製して保存し、必要なときに適量を取り出して浸透圧ショックによって DNA を得た。

12月19日、メセルソンは DNA の密度と同じ 1.69 (23°C) の DNA- CsCl 溶液を調製し、31,400 rpm で遠心を開始した。31時間後、UV で写真を撮ってから、機械を停止した。スタールは写真をデンストメーターにかけた。フェージ DNA がほぼ中央にややブロードなピークを形成していた。ピークは完全に対称ではなく、均一なサンプルではないかもしれないと思わせた。この時点では最終的にどの程度シャープなバンドが得られるかを予測できなかった。

12月25日、再びフェージ粒子の超遠心 (23時間) を行った ($\rho = 1.48$)。今回はフェージを安定化するために 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のゼラチンを入れた。前回と同じく、シャープな薄いバンドと大きなフェージのバンドが見られたが、フェージは前回よりややシャープで、フェージ粒子が安定化されたことが分かった。

12月27日、今回はインタクトなフェージを用い、濃度は4分の1にし、回転数は前回と同じく 31,400 rpm にした。DNA ほどシャープではないが、対称的なピークが得られた。

1 2月29日、27日の実験と同じで今度は44,700 rpm で実験を行った。回転数を増加したことによって、よりシャープなバンドが得られた。おそらく、このスピードがシャープなバンドが得られて、しかもセルの漏れが心配ない折衷案と思われた。次第に自信と希望を持つようになったメセルソンはこの実験のすぐ後、T4 DNA と同じ条件で Oleg Jardetsky からもらった仔牛胸腺の DNA の超遠心を行った。この DNA はT4 フェージ DNA とほぼ同じ位置にバンドを形成したが、T4 DNA より幅が広く、T4 ほど均一でないことが想像された。

T4 DNA を再現性よく分析できることを確信したので、メセルソンとスタールはいよいよ5BU置換 DNA の調製に取りかかった。

(以上、5回目)

8. 5BU-DNA の超遠心分析と非置換DNAの分離の成功まで

1957年1月1日午後、メセルソンが用意した5BU置換T4 DNAに元のT4 DNAを混ぜて $\rho = 1.71$ のCsClを用い、44,770 rpm で回したところ、底の方に奇妙なバンド"mystery band"が見いだされた。密度から考えてこれは5BU置換DNAと思われたが、他方のT4 DNAは検出できなかった。フェージの方がDNAより見やすいかもしれないと考えたメセルソンは引き続き5BU置換フェージを測定しようとしたが、なぜかバンドは何も見えなかった。

いろいろ実験してみると、毎回バンドの位置がずれ、再現性に問題があったので、何らかのマーカが必要と思われた。CCl₄などいくつか試してみたが、マーカには使えそうもなかった。

1月4日、5BU置換T4フェージの測定。 $\rho = 1.48$ CsCl。バンド検出失敗。

1月5日、5BU置換及び未置換T4フェージDNA。 $\rho = 1.71$ 。バンド1本検出。これはおそらく未置換DNA。5BUDNAが検出されなかったのは置換がうまくいっていなかったからかもしれないと考えた。

この頃、Model Eの順番待ちが実験に支障を来すようになっていた。メセルソンは可能な限り機械を予約する一方、深夜に実験を開始しなくてはならないこともしばしばだった。

1月7日、5日と同じ実験をCsCl溶液の密度を下げて($\rho = 1.60$)行ってみたが、やはり一本の鋭いバンドだけが観察された。

1月8日、念のため、 $\rho = 1.71$ で仔牛胸腺のDNAの実験を行った。これは実験の再現性を確認するためだったようだ。

1月9日、 $\rho = 1.71$ で再び5日と同様、5BUT4DNAと置換していないT4 DNAの混合溶液を測定。やはりバンドは1本。メセルソンは5BU置換がうまくいってなくて混合物だと思っていたものが実は通常のT4 DNAなのではないかと思いだした。そこで、 $\rho = 1.779$ に上げて5BUT4DNAを測定してみたが、バンドは見えなかった。念のため、 $\rho = 1.80$ にさらに上げてみたところ、少しブロードながらバンドが見えた。(なお、実験中にセルから若干の液漏れが見られた。液漏れは時々起こっている。)やはり、置換自体は問題ないことが分かった。この結果に勇気づけられて、メセルソンは直ちに置換していないT

4 DNA との混合物の遠心を行った。その結果、ブロードな 5 B U DNA が底の方に、シャープな非置換 T 4 DNA のバンドがメニスカス近傍に見えた。実験の最初の成功であった。この時点でメセルソンは初めて置換 DNA と未置換 DNA を自らが開発した CsCl 密度勾配法で分離できることを確信した。

1 つの問題点は 5 B U 置換 T 4 DNA が期待したほど完全に一樣ではなく、ピークがブロードになることだった。もう一つ、意外だったのは 5 B U 置換 DNA と非置換 DNA が予想以上に分離したことだった。予想では、密度勾配は 0.4 g/ml/cm 程度と計算され、密度の違いからは分離は実験結果の 2 分の 1 以下と考えられた。これはおそらく、pH 8.5 で、イオン化した 5BU に水素イオンの代わりに Cs⁺ が結合して、その結果予想より重くなったためだろうと考えられた（この考察は誤りで、次節で述べるようにそのように考える必要はないことが分かる。密度勾配の予測 0.4 g/cm⁴ が間違っていた。）。（以上、6 回目）

9. 理論的考察から DNA の分子量測定へ

メセルソンとスタールはこの時点で自分たちの見ている現象のしっかりした物理学的理解が重要だろうと考えた（ここら辺はさすが Pauling の弟子ですね。）。最初に依拠したのは The (Theodor の The) Svedberg と Kai Pederson 共著の "The Ultracentrifuge" (1940) だった。この本は長い間超遠心分析のバイブルであった。沈降平衡法では溶質の濃度を c とすると、

$$\frac{dc}{c} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 r dx}{RT}$$

と表される。（本の中の式は一部誤りだと思うので改変してあります。）ここで、 M は溶質の分子量である。 c を CsCl の密度 ρ で置き換えると、

$$\frac{\partial \rho}{\partial r} = \frac{\rho M(1 - \bar{v}\rho_0)\omega^2 r}{RT}$$

ρ_0 は水の密度、 M は CsCl の分子量、 \bar{v} は CsCl の偏比容である。（ここでも本の中の式の一部と変数の説明に誤りがあると思うので変更しました。）

この式に回転数 44,770 rpm を入れると $d\rho/dr$ 、即ち密度勾配は 0.4 g/cm⁴ となる。セルの中の溶液の長さは約 1 cm なので、真ん中の当たりの密度を 1.5 とすると、メニスカスで 1.3、底で 1.7 となる。この結果は当初の予想が間違っていなかったことを示唆した。

しかし、しばらくしてここでは CsCl の濃度でなくて、活動度を考慮しなくてはならないと考え直した。（電解質の場合、しかもここでの CsCl のように高濃度の場合には活動度係数はずいぶん小さいものになることが予想されます。CsCl の活動度はきっと文献があるのでしょう。）活動度を入れた式は

$$\frac{d\rho}{dr} = \frac{\partial \rho}{\partial a} \frac{aM(1 - \bar{v}\rho_0)\omega^2 r}{RT}$$

となる。ここで、 a は CsCl の活動度である。そうすると前の計算と違って密度勾配は 0.12 g/cm^4 と求められた。この値は上記の値の 3 分の 1 以下である。ということは CsCl 密度勾配遠心の分解能は 3 倍以上もあったということになる。これまで、5 BU 置換 DNA と非置換 DNA を同時に観測しようとしてなかなかうまくいかなかった理由がこれで明らかになった。2 つのバンドの位置が離れすぎていたのである。メセルソンは 5 BU のイオン化によって Cs が結合したために DNA が重くなったと考えたが、そう考える必要はなかったことになる。

メセルソンはここでさらにバンドの広がりについて理論的な考察を広げた。その結果、次式を得た。

$$C(r) = A_i \sqrt{\frac{m_i \beta}{\pi}} \exp\left(-\left[m_i \beta (r - r_i)^2\right]\right)$$

ここで、Lambert-Beer の法則が成り立つとすると、

$$O.D. = \frac{1}{\epsilon} \sum n_i m_i \sqrt{\frac{m_i \beta}{\pi}} e^{-m_i \beta x^2}$$

$$\beta = \frac{v \omega^2 \frac{\partial \rho}{\partial x}}{2RT}$$

である。メセルソンはまたバンドの半値幅 σ 、即ち標準誤差が次式で与えられることを見いだした。

$$\sigma^2 = \frac{2RT}{M \bar{v} \times d\rho/dr \times r_0 \omega^2}$$

この式から、半値幅が実験的に求められれば分子量を計算できることがわかる。また、バンドの幅は CsCl の密度勾配が大きいほど、そして回転数が大きいほど狭くなる、即ちピークが鋭くなることが分かる。メセルソンは上記の改正された密度勾配 (0.12 g/cm^4) をスタールの計算に入れ直して、T4DNA の分子量を 24×10^6 から 12×10^6 に訂正した。この値は実際の T4DNA の分子量の 10 分の 1 になっているが、その理由は後に述べる。

この方法が DNA のような大きな分子の分子量決定に役立つという結論は彼らを興奮させ、本来の目的から逸れてしばらくの間、分子量決定の方法をまとめることに時間が費やされることになった。ひとつには通常沈降平衡法が蛋白質の分子量決定には大きな力を発揮したにもかかわらず、DNA の分子量決定には（大きな電荷のために）向いていないことがあり、そのためこの方法が一般的に使えるということになれば非常に重要だろうと思われたことがある。彼らはまた、Schachman が同じことに気づくのを恐れていた。

超遠心分析が当時重要性の認識されてきた DNA の分子量決定には向いていなかったことから、ハーバード大学の Paul Doty らは光散乱に期待をかけて、既に光散乱によって小牛胸腺 DNA の分子量を発表していた。そこで、メセルソンは

ワトソンに頼んで Pual Doty の DNA を分けてもらいたいと頼んだ。

他方、5 BU 置換 DNA の置換率を 100%まで上げようというスタールの目論見はなかなか達成されなかった。その結果、5 BU 置換 DNA は分子量にどうしても幅ができていた。また、同時に行っていた 5 BU 置換フェージの X 線照射による生存率測定の実験は T4 フェージの光再活性化という現象によってきれいなデータがなかなか得られなかった。実験方法の改良については議論されたが、こちらは袋小路にはまっていた。

1 月下旬から超遠心分析機が混み合っていることを考えて、"wedge cell"を使うことにした。当時の撮影法はただシャッターを開けるだけだったので 1 回に一つの試料しか測定できなかった。そこで、ウィンドウの外側の面に傾斜をつけることによってそのセルからくる像を通常のセルからくる像とは別の位置（上）にくるようにして、一辺に 2 つのセルの観察を可能にしたものである。これによって測定の手数は 2 倍になった。また、先に述べたように、当時、CsCl は精製して使わなくてはならなかったが、その方法は時間のかかるものだった。そこで、活性炭を通すことを試みた結果、これが有効であることが分かり、以後この方法を用いることになった。

さて、分子量を測定するためには系が完全に平衡に達していなければならなかった。分子量が予想より小さいものであったことからこの点を Levinthal らから突かれていた。この点は実験によって確認されなければならなかった。

1 月 31 日夕刻、 $\rho = 1.697$ の CsCl 溶液を用い、37,460 rpm で T4 DNA を試料として実験を始めた。次の日の朝には既にシャープなバンドが形成されていたが、念のため、翌日まで測定を続けた。次の日の朝、バンドが全く変化していないことを確認してメセルソンは回転数を 27,690 rpm に落とした。理論からはバンドはやや半値幅が広がるのが期待された。4 時間後、バンドはやや幅が広がってそのままになっているように見えた。メセルソンはさらに 33 時間回転を続けて 2 月 3 日、回転数をさらに 19,160 rpm に落とした。4 時間後にはさらにバンドが広がるのが観察され、33 時間後に再び 27,690 rpm に戻された。バンドは再びやや鋭くなり、これでこの反応が完全に平衡にあることが示された。

それではこうして得られるバンドの形は本当に期待どおりのガウス関数になっているだろうか。ガウス関数であることが分かれば σ から上記の式を用いて分子量が計算できる。スタールは $\ln(y)$ を x^2 に対してプロットして直線になるかどうかをチェックすることにした。そのためには写真の濃淡を正確にトレースする方法を考える必要があった。そのために、メセルソンとスタールは当時星を撮影してその濃淡をトレースする機械を借りることができた。（ちなみに、最初再現性が得られず苦労したが、スタールの吸っていた煙草の煙のせいだと分かって実験室で煙草を吸うのはやめた。）この装置を借りて、まず濃淡が 3 つの波長で濃度に比例すること、即ち Lambert-Beer の法則が成り立っていることを確認した。さらに、スタールは拡大した濃度分布曲線を 0.045mm 間隔で測定し、曲線の形状が 1 個のガウス関数であることを確信した。

3 月 2 日、27,640 rpm で 33 時間回した後、一旦 3 時間 44,770 rpm にした後、

再び 27,640 rpm でさらに 4 4 時間回して実験を終えた。このデータを丹念に解析して、T4DNA の分子量は約 10×10^6 と決定した。(実は、この値は実際の分子量より一桁小さい。その理由は後に明らかになった。DNA の取り扱い方の問題であった。)

10. 平衡に達するまでに要する時間の問題

分子量決定問題はこれで決着したわけではなかった。専門家達の間で簡単には受け入れられなかったからである。T4 フェージの分子遺伝学の結果から、分子量が小さすぎるのではないかと考えられたこともあっただろう。レヴィンタールが測定が平衡に達しているかどうかについてまだ疑いを抱いていたので、メセルソンは理論的に平衡に達する時間を見積もることができないか考え始めた。メセルソンは化学科の博士課程の学生のナザリアンの助けを得て、1924 年の Mason-Weaver の論文に基づいて平衡に達する(平衡における値の 1% 以内の値に達する)に要する時間を計算したところ、54 時間と見積もられた。これは明らかにメセルソン達の実験時間より短く、実験では平衡に達しているという自信を深めることができた。

スタールは得られた濃度分布曲線から DNA の分子量は 20×10^6 と見積もった。明らかにこの結果は 1 個のバクテリオフェージの含む DNA 量とは相容れなかった。この値を信じると、バクテリオフェージ粒子中には 12 本もの DNA がはいっている、ということになる(これは約 30 kbp で、現在の知見からは 6 倍)。続いてサケの精子の DNA の分子量を測定し、これは 8×10^6 の値を得た。これは Doty が光散乱によって得ていた値に近かった。しかし、数日後前に求めた式に誤りがあることに気づいた。分子量を求める式の分子の 2 という数字は 1 であるべきで、結局 T4DNA は 10×10^6 、サケの方は 4×10^6 ということに落ち着いた。ただし、サケの DNA は T4 フェージの DNA より長さが均一ではない。

超遠心密度勾配遠心法で分子量を決定するという新しい分子量決定法は一時カルテク内で大きな話題となったが、そのうち話題に上らなくなっていった。

11. メセルソンの学位論文提出

1957 年 4 月から 5 月中旬にかけてメセルソンは博士論文の仕上げに没頭した。学位論文は関連のない二部から構成され、第一部が「密度勾配中における高分子の沈降平衡と核酸研究への応用」であり、第二部は「N-N'-ジメチルマロンアミドの結晶構造」であった。

カルテクの化学科では、実験の根拠となる理論を詳述することが伝統となっており、メセルソンも CsCl 密度勾配遠心中での DNA の濃度分布を求める熱力学的方法を詳しく述べている。ここは我々にも参考になるところなので、出発の式と結論の式を挙げておきたい。

メセルソンは遠心力場にあるセルの内部では平衡状態で化学ポテンシャルが一樣でなければならない、という条件から出発した：

$$M_i(1-\bar{v}\rho)\omega^2 r dr - \sum_k \frac{\partial \mu_i}{\partial C_k} dC_k = 0$$

ここで ρ が r の関数であるとし、高分子（ここでは DNA 分子）が存在する領域では ρ は直線的に変化すると考えて、最終的に次式を得た。

$$C_{p, x}(r) = C_{p, x}(r_0) e^{-x \left[\frac{(r-r_0)^2}{2\sigma^2} \right]}$$

これはガウスの誤差関数の形をしていて、

$$\sigma^2 = \frac{RT}{M_{PXn} \bar{v}_{PXn} \left(\frac{d\rho}{dr} \right)_{r_0} \omega^2 r_0}$$

である。平衡に達するのに要する時間については拡散係数と沈降速度を濃度時間変化と関係づける連続の方程式から微分方程式を導いてこれを解き、平衡状態の値に 1% 以内に近づくまでに要する時間を与える次式を得た。

$$t^* = \frac{\sigma^2}{D} \left(\ln \frac{L}{\sigma} + 1.26 \right)$$

（現在では、平衡状態に達するのに要する時間は 1958 年の Baldwin & Van Holde の与えた次式の方がよく引用される。（筆者注））博士論文第一部には以下、5-ブromouracil による変位生成の機構、得られた T4 フェージの分子量についての考察などが述べられ、最後にこの方法が近い将来に DNA の複製に関するいくつかのモデルを厳密に証明する実験法を与えるであろうと述べている。DNA の分子量が小さかった理由は後に明らかになるが、この時点では実際に小さいものとして議論が進められている。

メセルソンの最終口頭発表と試験は 5 月 23 日午後 1 時半に行われた。審査委員長はライナス・ポーリング、他の審査員はジェリー・ヴィノグラード、物理のリチャード・ファインマン、物理化学のハーデン・マッコネル（NMR）、免疫学のダン・キャンベルであった。ファインマンは明らかにメセルソンの博士論文を読んでこなくて、始まる前に部屋の隅で急いで眺めていたが、メセルソンの流れの方程式のところを見るなり、これはもっと簡単な計算法があるよ、と言って黒板ですらすらと解いて見せた。

発表とそれに続く質問も無事終わり、最後に部屋に残ったポーリングは“新しいことがどんどん分かってくるこの時代にいて幸せだよ。”と一言言ったという。ポーリングが自分のフィールドから離れていく弟子に対して、どう思っていたかは不明だが、明らかに新しい分野に挑戦していい仕事をしたメセルソンを祝福していた。博士論文の超遠心分析の部分は Meselson, Stahl & Vinograd の 3 名の著者で communicated by Linus Pauling として 5 月 27 日に PNAS に提出された。

（以上、7 回目）

1 2. 変性 DNA の超遠心分析

メセルソンとスタールがしばしば複製問題から離れて分子量決定問題に熱中している間にも、複製問題を解決しようとする世界の情勢は止まったままではなかった。1956 年 10 月にはテイラーらは "The Organization and Duplication of Chromosomes as Revealed by Auto-radiographic Studies Using Tritium-Labeled Thymidine" (Taylor, Woods, and Hughes) と題した論文を発表し、コルヒチン存在下でソラマメの芽生えの染色体の複製をオートラジオグラムによって観察した結果は半保存的な複製を支持していた。

他方、55 年頃から Rene Thomas らによって DNA が熱や pH によって変性することが報告され、変性によって吸収が増加し、二次構造は崩れてランダムコイルになると報告された。Stacey と Alexander は 4 M 尿素も DNA を変性させ、分子量が半分になると報告した。しかし、Doty のグループは変性した DNA は密度が高くなるだけで、若干の水素結合によって二本鎖はつながっていると考えていた (1957 年)。

メセルソンとスタールは Thomas らの報告に興味を持って、二本鎖が分かると各一本鎖を彼らの方法で分けることができるのではないかと考えた。

6 月 29 日、T4DNA を 5 分間 100°C で熱した後、 $\rho = 1.716$ の CsCl、44,700 rpm で 24 時間遠心して 1 本の鋭いバンドを得た。次に、同じ溶液に熱処理をしていない試料を加えて遠心したところ、今度は 2 本のバンドが得られた。2 本のバンドはよく分離していた。“重い側”のバンドは少しブロードでより拡散していたので、より低分子であることを閉めていると思われた。これは Doty の見解とは異なり、鎖は分離していることを示していると考えられた。

5-BU 置換 DNA の方の実験にも進歩があった。スタールは培地にチミンの代謝を阻害するアミノプテリンを加えることによって完全に 5BU に置換した DNA を調整することができるようになっていた。

7 月 8 日、メセルソンは $\rho = 1.779$ の CsCl 中で 5-BU 置換 T4DNA の遠心を行った。実験の結果を 1 月 13 日の結果と比べたところ、今回の方がより鮮明で、期待された通り高密度側に現れていた。実験終了後、メセルソンは直ちにこれに通常の T4DNA を加えて再び遠心した。期待通り、2 つのバンドがメニスカス付近と底付近に観測され、いよいよ複製実験に取りかかる準備ができたと思われた。この間、カルテクの予算要求が通って、Model E がシンスハイマーの研究室に 1 台、ヴィノグラードのところにさらに 1 台入り、計 3 台となった。

メセルソンとスタールは 5-BU 置換 DNA フェージを通常の培地で培養したバクテリアにバクテリア当たり 13 フェージの割合で感染させ、21 分後に溶菌させ、子孫フェージを分別遠心で精製した。7 月 24 日、初めての複製実験の超遠心分析が行われた。結果は明らかで 2 本のバンドが得られ、重い DNA と軽い DNA が見えていることは明らかだった。しかし、残念ながら中間の密度を持った DNA は観測されなかった。

スタールが楽観的だったのに対してメセルソンは悲観的になっていた。実験を何度繰り返しても中間の密度を持つはずのハイブリッドの DNA は観測されなか

った。デルブリュックはテイラーの実験から高等生物では半保存的な複製が起こっているのだろうが、ファージの複製は高等生物とは違うかもしれないと考えたりした。また、テイラーの実験では染色体のほんの一部を見ているので、ゲノム全体の複製を表していないかもしれないとも考えた。メセルソンは変性 DNA の実験も繰り返していたが、実験の結果は（なぜか）変性しても分子量は変わらないという、Doty の結果を支持しているように見えた（後に 99°C で 20 分処理すれば 2 つの鎖は分かれることが確かめられた）。

夏のコールドスプリングハーバーのシンポジウムのスターはセイモア・ベンザーで、彼は T4 ファージの r II 遺伝子の詳細なマッピングについて報告した。メセルソンは次代を担うプリンスと目された。メセルソンは 5-BU のケト：エノールの比率の計算について報告し、スターはメセルソンと共に 5-BU の突然変位生成の機構について報告した。

ある時、アイソトープのカタログを見ていて、はたと気がついた。ずっと以前、まだ実験を始める前に 15N を使う可能性を考えたときに、これは密度の違いが小さすぎて超遠心分析で分離することは不可能だろうと考えて止めたのだったが、今、5-BU 置換 DNA と非置換 DNA がこれほどよく分かれるのだから 15N でも分かれるはずだ、ということであった。それに 5-BU よりずっと天然の状態に近い。メセルソンは 15N を使う可能性を真剣に考え始めた。また、DNA は大腸菌のものを使うことにした。実は、メセルソンは 2 月頃、まだ 5-BU を使っていた頃から、DNA としては大腸菌を使うことを考えていた。ファージよりもバクテリアの方が世代を追ってサンプリングを行うのが容易だと考えたからである。

（以上、8 回目）

1 3. 世にも美しい実験

9 月末に注文していた 15N が届いた。15NH₄Cl をを唯一の窒素源として大腸菌を培養してみたが、大腸菌は問題なく増殖した。いくつかの予備実験の後、いよいよ目的の実験に取りかかった。

1 0 月 2 1 日または 2 2 日、グルコース最小培地 (M9) に 15NH₄Cl を唯一の窒素源として加えたものを 1 2 時間培養して 2×10^8 まで培養した。この間、大腸菌は 14 世代にわたって複製を繰り返したことになる。この時点で培地を 14NH₄Cl を含む最小培地で 10 倍に希釈することによって瞬時に 14N に切り替えた。この培地の中にはヌクレオシドも入れておいた。本当はヌクレオシドではなくて DNA のより直接的な前駆体であるデオキシヌクレオシドを入れることによって持ち越しの N15 がデオキシヌクレオシドに混入してくることを防ぎたかったのだが、手持ちのデオキシヌクレオシドがなかった。しかし、実際にはこれは杞憂で影響は全く現れなかった。ここで最初のサンプルを取り、DNA 抽出のために急激に氷冷し、溶菌してこれを保存した。2 人はさらに約 1 5 分おきに 5 回にわたってサンプルを採取した。

ここで最初のサンプルを取り、DNA 抽出のために急激に氷冷し、溶禁止手これを保存した。

この間、希釈によって大腸菌の濃度が 1×10^8 から 2×10^8 の間になるように調整

した。

10月23日(水) 6:27 p.m.、14N培地に移す前の試料の実験を開始した。22時間後、1本の鋭いバンド(重・重)が観測された。24日 3:55 p.m.、2番目の試料を遠心した。1本の鋭いバンドとその近くに薄いもう一つのバンドが見えた。次の試料も2本のバンドが見いだされ、今度は(重・重)バンドがやや薄くなって(重・軽)のバンドが濃くなってきた。次の試料はち丁度1回目の複製が終わったところのものだった。ここでは1本の(重・軽)鎖のみ観測された。次の試料では(軽・軽)鎖が期待された位置に見いだされ、(軽・重)鎖も観測された。さらに次の2回複製直後の試料では(軽・軽)鎖と(重・軽)鎖が1:1で見られた。こうして、半保存的複製が見事に証明された。

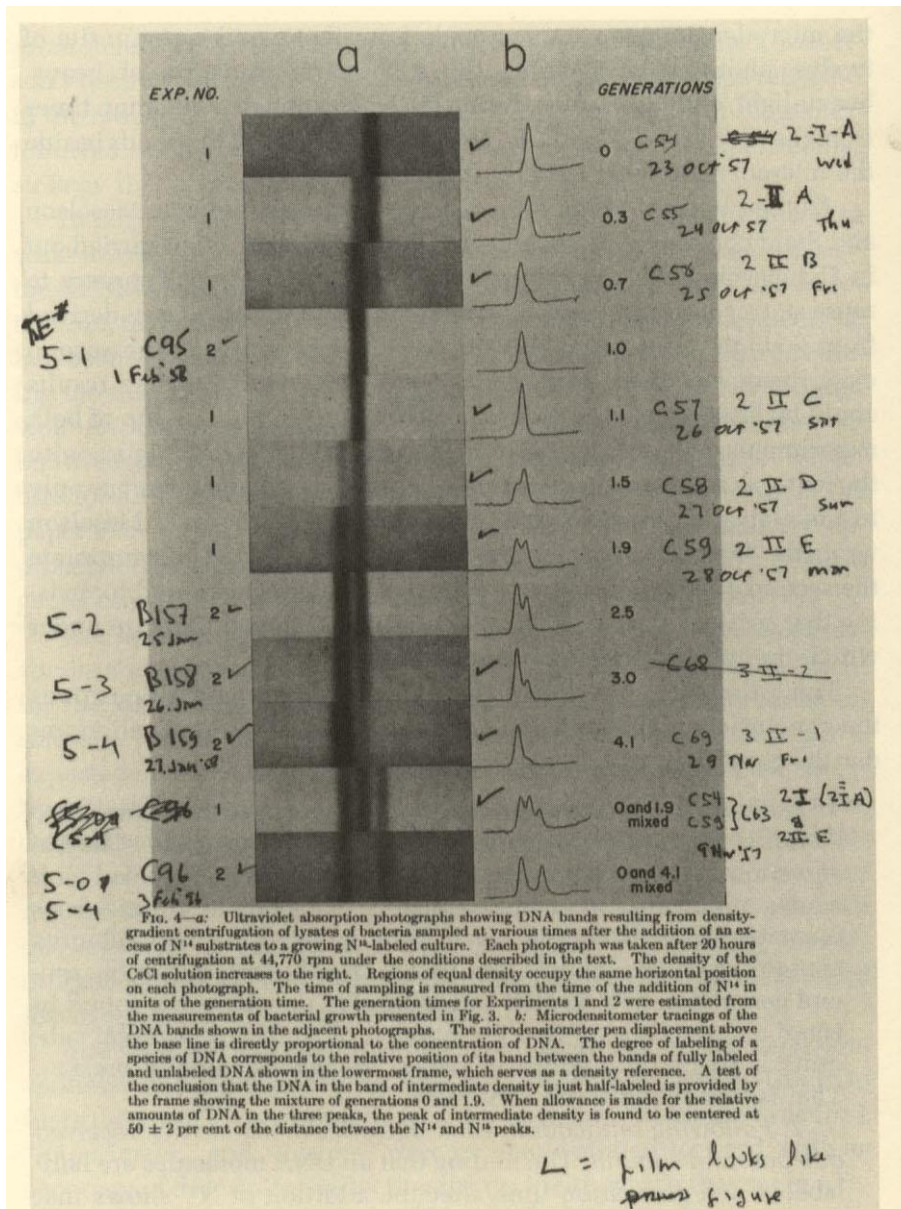


Fig. 11.6. Composite photograph containing positives made from films of the transfer experiment conducted 23–30 October 1957 (here labeled "1") and the transfer experiment conducted 24 January to 3 February 1958 (here labeled "2"), published in Meselson and Stahl, "Replication of DNA," p. 675. On this copy of a reprint, Meselson and Stahl added, in 1996, the dates and centrifuge runs of the films from which the composite was constructed.

14. その後

これで目的は達成され、プロジェクトは終わったように思えるが、メセルソンはまだ終わったとは思っていなかった。デルブリュックは自分の以前の保存的モデルが間違っていた事は認めたが、ワトソン-クリックの複製モデルが正しいと証明されたわけではないと言い、メセルソンも同意した。生物物理の人たちにとって、半保存的複製の際に生じる鎖の絡まり合いの問題は深刻に思われた。そこ

で考え出したのがディスパーシヴモデルというもので、複製は保存的に行われるが、元の2本鎖と新しい2本鎖がある長さで組み換えを起こして混ざり合うというものだった。このモデルでもメセルソン達の結果が説明できるのだった。

この話はさらに続き、この実験が教科書としてはワトソンの「遺伝子の分子生物学」に初めて取り上げられたが、説明の図があたかも分離用の超遠心機で行われたような印象を与えるために、超遠心分析機で行われたことが意外に知られていない、などということが語られますが、ここで、一応終わりとします。

(以上9回目)