

|         |  |
|---------|--|
| 氏 名     | 左 子 芳 彦<br>さ こ よ し ひ こ   |
| 学位の種類   | 農 学 博 士  |
| 学位記番号   | 農 博 第 388 号  |
| 学位授与の日付 | 昭 和 58 年 5 月 23 日  |
| 学位授与の要件 | 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当  |
| 研究科・専攻  | 農 学 研 究 科 水 産 学 専 攻  |
| 学位論文題目  | Studies on Heat-Induced DNA Injury and Its Repair<br>in <i>Bacillus subtilis</i><br>(枯葉菌の DNA の加熱による損傷とその修復に関する研究) |

論文調査委員 (主 査)  
教 授 門 田 元 教 授 駒 野 徹 教 授 池 田 静 徳

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、枯草菌の DNA が加熱に対してどのような挙動を示すかを孢子と栄養細胞について調べることによって、細菌細胞の熱による死滅の分子機構を探ろうとした研究の結果をとりまとめたものである。その主な内容は次の通りである。

1) 孢子を90℃前後で10分程度加熱すると、グリシン、スレオニン、ホモセリン等を要求する突然変異株が高頻度で出現することを見出し、加熱によって孢子に何らかの遺伝的損傷が生じうることを明らかにした。

2) 加熱によって DNA がどのような損傷を受けるかを、 $[^3\text{H}]$ チミンでその DNA をラベルした孢子についてアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法を用いて調べ、孢子は酸性で加熱されると、その DNA が1本鎖切断されて低分子化することを明らかにした。一方栄養細胞では、孢子の場合には DNA 鎖の切断を生じない50℃での比較的温和な加熱によっても DNA の1本鎖切断が起るが、この反応は pCMB によって阻害されることから、この場合の DNA 鎖切断にはヌクレアーゼが関与しているとした。細胞から抽出精製した DNA を *in vitro* で酸性加熱した後に沈降分析した場合にも DNA は低分子化することを認めた。また、 $[^3\text{H}]$ アデニンでラベルした細胞の DNA を酸性で加熱するとアデニンが遊離することを見出した。

これらの事実から、酸性での加熱によって孢子の DNA 分子上のプリン塩基が非酵素的に脱落し、その部位が密度勾配遠心法のアルカリ性条件下で  $\beta$ -elimination によって切断するものと推論した。

3) 加熱によって損傷を受けた孢子の DNA が、孢子の発芽時にどのような挙動を示すかを調べ、孢子 DNA 上に生じた脱プリン部位は発芽開始後2～3時間で完全に修復されることを明らかにした。

4) 加熱によって生じた脱プリン DNA の修復系についても詳細な検討を加えた。まず、脱プリン部位で DNA を切断する APendonuclease を、栄養細胞抽出液から硫酸ストレプトマイシン処理、硫酸分画、及び DEAE-セルロース、DEAE-セファデックス、セファデックス G-200、DNA-セルロースの各クロ

マトグラフィーを用いて電気泳動的に均一な標品にまで精製した。次にこの酵素の性質を詳しく調べ、それが分子量 26,000 のサブユニット 4 個から成ること、脱プリン DNA に特異的に活性を示し、未処理 DNA やアルキル化 DNA を基質としないこと、反応には  $Mg^{2+}$  が必須であり、 $Ca^{2+}$  によって阻害されること、NaCl には強い耐性を示すこと、及び pCMB によって完全に阻害されることを見出した。切断末端についても検討し、本酵素は脱塩基糖の 3' 側で 3'-OH と 5'-リン酸の切断末端を生ずる新しい APendonuclease であることを明らかにした。

5) 胞子の発芽時に本酵素の活性がどのように変化するかについても調べ、その活性は胞子そのものには殆ど見出されないが、発芽開始後 2 時間前後から出現することを見出した。

これらの事実は、加熱によって胞子の DNA 上に生じた脱プリン部位が胞子の発芽後に生合成される APendonuclease と除去修復系とによって修復されることを示している。

### 論文審査の結果の要旨

加熱殺菌法は食品加工等の分野で古くから広く用いられてきた方法であるが、その原理としての加熱による微生物細胞の死滅機構はまだ十分に解明されていない。

本論文の著者は、細胞の基本的な構成要素である DNA が加熱との関係では今までに殆ど研究されていないことに着目し、枯草菌の胞子及び栄養細胞に対する熱の作用機構を、DNA の挙動を調べることによって研究した。その成果の要点は次の通りである。

1) 胞子を 90℃ 前後で約 10 分間加熱すると、グリシン、スレオニン、ホモセリン等を要求する突然変異株が高頻度で出現することを見出し、加熱によって胞子に何らかの遺伝的損傷が生じうることを初めて明らかにした。

2) 加熱によって DNA がどのような損傷を受けるかを、 $[^3H]$  チミンでその DNA をラベルした胞子についてアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法を用いて調べ、胞子は酸性で加熱されるとその DNA に 1 本鎖切断を生じて低分子化することを明らかにした。この事実を *in vitro* でも確認し、さらに  $[^3H]$  アデニンでラベルした細胞の DNA を酸性で加熱するとアデニンが遊離することをも見出した。これらの結果から、酸性での加熱によって胞子の DNA 分子上のプリン塩基が非酵素的に脱落し、その部位がアルカリ性で  $\beta$ -elimination により切断されるものと推論した。

3) 加熱によって胞子の DNA 上に生じた脱プリン部位は発芽開始後 2 ~ 3 時間で完全に修復されることを明らかにした。

4) 脱プリン部位で特異的に DNA を切断する APendonuclease を、栄養細胞抽出液から種々のクロマトグラフィー等を用いて電気泳動的に均一な標品にまで精製し、詳しくその性質を調べることにより、本酵素が分子量 26,000 のサブユニット 4 個から成ること、脱プリン DNA に特異的で、未処理 DNA やアルキル化 DNA には活性を示さないこと、反応には  $Mg^{2+}$  が必須であり、 $Ca^{2+}$  によって阻害されること、pCMB によって完全に阻害されること等を見出した。切断末端についても検討し、本酵素は脱塩基糖の 3' 側で 3'-OH と 5'-リン酸の切断末端を生ずる新しい APendonuclease であることを明らかにした。

5) 本 APendonuclease の活性は、孢子そのものには見られないが、発芽開始 2 時間後から出現することを見出し、加熱によって孢子の DNA 上に生じた脱プリン部位は発芽後に生合成される本酵素と除去修復系によって修復されるものと結論した。

以上のように本論文は、孢子の特性をたくみに利用して、加熱による細菌細胞の死滅の分子機構に重要な新知見を加えたものであり、微生物生理学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。