

氏名	森 嶋 伊 佐 夫 もり しま い さ お
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 139 号
学位授与の日付	昭 和 46 年 11 月 24 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 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	STUDIES ON THE REGULATION MECHANISM OF DNA REPLICATION IN BACTERIOPHAGE ϕX174 (バクテリオファージ ϕ X174 における DNA 複製の制御機構に 関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 小 野 寺 幸 之 進 教 授 緒 方 浩 一 教 授 柄 倉 辰 六 郎

論 文 内 容 の 要 旨

ϕ X174 は球形のファージで、遺伝物質として環状の一本鎖 DNA をもち、その分子量は 1.7×10^6 である。このファージが宿主菌に感染して子ファージが作られる過程は三段階に分けられる。(1)ファージ DNA が宿主菌に侵入してただちに二本鎖 (親 RF) となり、細胞膜上の特定の位置に付着する。(2)ついで、親 RF の半保存的複製が起こり、子 RF が蓄積される。(3)子 RF の相補性 DNA 鎖が鋳型となって一本鎖の子ファージ DNA が合成され、これは完成と同時にコートタンパク質によって包まれて子ファージが完成する。これらの過程のうち子 RF から子ファージ DNA が合成される際の制御機構についてはほとんどわかっていなかった。そこで、この機構を明らかにするため ϕ X174 の種々の変異株を用いて、DNA およびタンパク質合成阻害剤による ϕ X174 の DNA 合成とタンパク質合成との関連性を追求して、上記の制御機構を考察しようとした。

ヒドロキシウレア (HU) はウイルスの DNA 合成を特異的に阻害することが知られている。*E. coli* HF 4704株 (*hcr⁻, thy⁻*) の DNA, RNA およびタンパク質合成を、それぞれ ^3H -チミン, ^3H -ウラシルの酸不溶性画分への取り込みによってしらべたところ、0.1M の HU によって DNA 合成は90%以上の阻害を受けるが、RNA, タンパク質合成はほとんど影響を受けない。一方、*E. coli* HF 4701株に ϕ X174*am3* を感染させて HU 存在下でのファージ増殖をしらべてみると、0.1M HU によってファージの増殖は0.1%以下に押えられるが、HU 添加後任意の時間に HU を除去すると、ファージ増殖は正常に回復した。またマイトマイシンCで処理した宿主菌では、0.1M HU の添加によってファージ DNA の合成はほとんど停止するが、コートタンパク質の合成は感染後20分までは正常な場合とほぼ同程度に起こる。このことはファージ DNA に対して大過剰のコートタンパク質が存在することを示している。

つぎにマイトマイシン処理を行なった *E. coli* EF 4704株に ϕ X174*am3* を 0.7M HU の存在下で感染させ、15分後に HU を除去すると同時にクロラムフェニコール (CM) を $30\mu\text{g/ml}$ または $150\mu\text{g/ml}$ で添加し、ファージの増殖およびファージ DNA 合成をしらべた。その結果、ファージの増殖、DNA 合

成はともにほとんど認められなかった。このことからファージ DNA の合成とコートタンパク質合成とは緊密に連係しており、コートタンパク質は遊離の状態ではきわめて不安定で、DNA と結合できないコートタンパク質は常温で失活して行くというモデルが考えられる。

子 RF の合成には $\phi X174$ のシストロン VI タンパク質が必要であるが、このタンパク質合成は $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度の CM によって全く阻害される。そこでファージ感染後適当な時間に CM を添加してタンパク質合成を止めることによって、RF 合成とタンパク質合成の関連性を種々の条件で検討した。

E. coli HF 4704 に $\phi X174\text{am}3$ を感染させ、ファージ DNA 合成に対する CM 添加の影響をしらべた。CM 無添加の場合に合成されたのは大部分一本鎖のファージ DNA であった。また感染 8 分後に $30\mu\text{g}/\text{ml}$ の CM を添加すると、合成される DNA はすべて二本鎖の RFI であった。すなわち CM 添加前に作られたシストロン VI タンパク質が活性を持続し、これによって RF が合成されるものと考えられる。

さらに、高温では一本鎖 DNA を合成できない $\phi X174\text{am}3\text{ts}79$ を用いて同様の実験を行なった結果、RF 合成の停止にはある種のタンパク質合成が必要があり、またその合成はファージ感染後 10~15 分間に行なわれることが明らかとなった。そしてこのタンパク質が RF の半保存的複製を停止し、一本鎖 DNA の合成を開始させるものと結論できる。

なお他の $\phi X174$ 変異株についても同様の結果が得られた。これらのことは RF 合成の停止に関与するシストロンは既知のもの以外の新しいシストロンであることを示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

$\phi X174$ は大腸菌を宿主とする小型の DNA ファージで、その DNA は環状一本鎖であることが約 10 年前に明らかにされた。このファージ DNA の複製過程については、一本鎖 DNA がはじめに二本鎖 DNA (親 RF および子 RF) となり、この二本鎖を経て一本鎖の子ファージ DNA が合成されるという機構が提出されていた。しかし、二本鎖から一本鎖が合成される過程の制御機構については分子生物学の重要課題の一つとして残されていた。

著者はファージ増殖の際に起こる DNA 複製のこの第 3 の段階の制御機構を解明するため、種々の $\phi X174$ 変異株を用いて DNA 合成とタンパク質合成との関連性を追求した。

その方法として大腸菌が $\phi X174$ に感染して起こるファージ DNA の合成に対するヒドロキシウレアの阻害ならびにタンパク質合成に対するクロラムフェニコールの阻害の様相を詳細に検討した。その結果、まずファージ DNA 合成とコートタンパク質合成とは緊密に連係して起こることを明らかにした。さらに RF 合成の停止にはある種のタンパク質が必要であり、これはファージに感染後 10~15 分間に合成されることを明らかにし、このタンパク質はファージに特異的で、一本鎖 DNA の合成を開始させる機能をもつことを示唆した。すなわち、二本鎖 DNA から一本鎖 DNA 合成への切り換えがこのタンパク質によって制御され、しかもこのタンパク質の生成は既知のシストロン以外の新しいシストロンの存在によるという機構を提示している。

このように本研究は $\phi X174$ の DNA 複製の制御機構を初めて解明したもので、核酸の生化学の分野

に貢献するところがきわめて大きい。

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。