

氏名	小 山 一 こ やま はじめ
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 357 号
学位授与の日付	昭 和 50 年 3 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	大腸菌プラスミッドの保持機構に関する遺伝生化学的研究

論文調査委員 (主査) 教授 由良 隆 教授 香月裕彦 教授 川出由己

### 論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌のプラスミッドの一種 *ColVBtrp* は宿主細胞の染色体とは独立に自律性遺伝単位として染色体当り一箇存在し、細胞分裂時には染色体と同調して娘細胞に規則的に分配される。

申請者はこの様ないわゆる stringent 型のプラスミッドの安定な保持が如何なる機構で保証されるかという問題に接近する目的で、*ColVBtrp* の変異株を多数分離し、その性質の遺伝生化学的解析を行なった。

先づプラスミッド変異株を容易に多数分離する方法を開拓した。*ColVBtrp* プラスミッド上にあるトリプトファンオペロンにミスセンス変異 (*trpA24*) をもち、宿主染色体上の同オペロンを欠失する株 (トリプトファン要求株) から、ニトロソグアニジン処理によりトリプトファン非要求性の複帰変異株を分離した。ニトロソグアニジンは DNA 複製点付近に同時に多くの塩基置換を起させる為、このらの *Trp*<sup>+</sup> 株ではトリプトファンオペロン上のみでなく、それに隣接するプラスミッド固有の遺伝子上にも変異を起したものが多くと期待される。実際この方法によると、*Trp*<sup>+</sup> 株の半数以上のものがプラスミッド固有の機能に変異を起しており、その中にはプラスミッドの保持機構に欠陥のあるものも含まれることが分った。

次にプラスミッド保持変異が宿主菌の種々の生理機能に及ぼす影響を調べる為、それぞれの変異型プラスミッドを接合により、新しい宿主に移して得られた *Col*<sup>+</sup> 株の諸性質を系統的に調べた。その結果解析した10株の中には、プラスミッド保持の異常のみでなく、宿主菌の生育を温度感受性にするもの、細胞分裂を阻害してフィラメント状細胞を作るもの、デオキシコール酸やメチレンブルーに感受性を示し細胞膜構造が変化したと思われるものなどが高率で見出された。そこでこれらの多様な表現型変化のすべてを同時に示す2株の変異株について高温で生育可能な複帰変異株を分離してその性質を調べた所、何れの場合もプラスミッド上の単一変異がすべての表現型変化をもたらすことが明らかとなった。

さらに変異型プラスミッド DNA の複製、宿主染色体 DNA の複製、タンパク合成、細胞分裂 (特に

隔壁形成)などを解析し、それらの結果から次の様な結論に達した。(1)プラスミッド上の単一変異により宿主菌の増殖に不可欠の生理的機能に障害をもたらすことがある。(2)プラスミッド保持能が温度感受性になった変異型プラスミッドは何れも宿主の増殖を温度感受性にする。(3)変異型プラスミッドの一株では、その複製はほぼ正常であるが、恐らくその娘細胞への分配に欠陥があり、その結果宿主細胞の隔壁形成が妨げられると考えられる。これらの結果は、プラスミッドが宿主細胞内において単なる付加的因子として存在するのではなく、宿主の分裂サイクルに有機的に組みこまれている可能性を示唆するものである。

### 論文審査の結果の要旨

申請者の用いた大腸菌プラスミッド ColVB $trp$  は大腸菌K12株の性決定因子 (F因子) と同様に細胞間の接合を誘起し、それ自身 Col<sup>-</sup> 菌に対し高頻度で伝達される。1963年 F. Jacob らはF因子の伝達を含めて DNA 複製制御の一般的な仮説 (レプリコン説) を提出したが、F因子の複製と分配 (保持機構) の研究はその後余り本質的な進展を示していない。特に、F型プラスミッドの場合は宿主染色体の複製分配との関係が興味の焦点となるが、宿主の分裂サイクルにおけるプラスミッド複製時期の問題や、プラスミッド複製保持に対する宿主遺伝子の関与の問題など最近漸く系統的に研究される様になった。

申請者はこの問題をプラスミッドの保持変異株の分離とその解析により明らかにすることを目的とし、先づプラスミッド変異株、特に保持変異株を容易に多数分離する方法を確立した。その方法の利点としては、(1)効率が極めて高い (従来100~1000倍)。(2)適当な選択マーカーをもつ他のプラスミッドにも広く適用できる。(3)多様な表現型を示す変異株特に直接選択することが困難なものも分離できる。(4)得られた変異株は互に独立である。などがあげられ、非常に有用な方法と思われる。

次にプラスミッド保持変異株の性質を詳しく解析した結果、その多くのものが低温 (30°) ではほぼ正常であるが、高温 (40°C) ではプラスミッド保持に異常を示すことが分った。ここで興味深いのは、これらの変異型プラスミッドをもつ細胞の増殖が何れも温度感受性になるという事実である。さらにその中のあるものは低温で細胞膜構造に変化を起しており、高温では細胞間隔壁の形成が阻害されるらしいことが示された。これらの多様な表現型変化が少くとも解析された2例については、プラスミッド上の単一変異によることが分ったことは、プラスミッド保持機構と宿主増殖との有機的な相互関係を立証する第一段階の結果として重要な意味をもつものと思われる。

これらの結果から、申請者はF型プラスミッドは従来考えられてきた様に宿主菌の増殖にとっては必要であって、単に付加的因子として染色体とは独立に存在するというのではなく、その正常な複製と分配は宿主菌の正常な分裂増殖にとっても必須の条件となっているとの考えに到達した。この仮説の妥当性はさらに実験的に検討の余地を残すが、プラスミッドと宿主細胞の間の相互関係に関する興味ある考え方と思われ、今後この分野での研究の発展に一つの方向と指針を与えるものとして高く評価される。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。