

氏 名	堀 内 嵩 ほり うち たかし
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 392 号
学位授与の日付	昭 和 51 年 3 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	大腸菌 DNA リガーゼの生理的機能に関する分子遺伝学的研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 由 良 隆 教 授 香 月 裕 彦 教 授 高 浪 満

論 文 内 容 の 要 旨

DNA リガーゼは、二重らせん DNA (デオキシリボ核酸) の片方の鎖に切れ目が生じた時、それをホスホジエステル結合によって連結する酵素である。1967年頃、大腸菌をはじめ多種の生物における存在が、発見・確認された。その生理的機能としては、DNA の複製、修復、組換えなどの諸過程に、極めて重要な役割を演じるものと考えられる。

特に DNA の複製に関しては、Kornberg の酵素 (DNA ポリメラーゼ I) が必須の役割を演じると考えられていたのに対し、1969年に Cairns らが大腸菌のアンバー変異株として DNA ポリメラーゼ I の重合活性を失った株 (*pol A1*) を分離したところ、これが致死性を示さないという事実が判明した。そこで申請者はまず、*pol A1* 株を条件致死とする第二の変異が発見できるかどうか調べた結果、多数の変異株を分離した。そのうちの1つが DNA リガーゼ欠損変異株であった。つまり、これら両酵素が同時欠損すると、DNA 複製に異常が起り致死性となる。

その後、更に一層明晰な DNA リガーゼ変異株が Nagata ら (1974) によって分離された。これは大腸菌 DNA リガーゼ構造遺伝子 (*lig*) にアンバー型ナンセンス変異を起したものである。申請者は、この株について生化学的・分子遺伝学的に極めて詳細な解析を行なった。その結果、DNA リガーゼが失活すると、DNA 複製の中間体 (岡崎断片) の連結が完全に阻害されることが判明し、この酵素が DNA 複製に不可欠であることが証明された。

更に予期せざる発見は、この酵素の失活が DNA の親鎖 (鋳型鎖) の崩壊をひき起こすということであった。申請者はこの崩壊過程を詳細に解析し、以下の諸事実を確認した。

1. この崩壊はエネルギーを要求する過程である。(DNP 存在下では崩壊は起らない)。
2. はじめに二重鎖 DNA に切れ目が入り、次いで細片に切断されて遂には酸可溶性になってしまう。(超遠心分析の結果)。
3. その際、細胞核構造体が消失する。

4. 大腸菌の染色体 DNA だけでなく、感染によって侵入したラムダファージなどのゲノム DNA も同様に崩壊する。

5. 調べた限りの DNase については、それらの関与は認められなかった。しかし、DNA 複製を阻害すると崩壊が阻止される。

以上の結果は、DNA の半保存的複製機構に必須の一過性の切断と再結合の可能性を示唆しており、極めて重要な発見と考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、デオキシリボ核酸 (DNA) の複製、修復等における DNA リガーゼの役割を解明する上で極めて重要な、生化学的・分子遺伝学的研究を行なったものである。

まず申請者は、Kornberg の DNA ポリメラーゼ欠損大腸菌変異株 (*pol A*) に第二の突然変異を起させ、これを条件致死性とする変異株を多数分離し、その諸性質によって大別 5 群に分類した。そのうちの 1 群は、新たに DNA リガーゼ活性が低下した変異株であることが、粗抽出液の *in vitro* 活性の測定およびいくつかの分子遺伝学的証拠によって確認された。この変異株における DNA 合成様式、紫外線感受性等の解析結果に基づき、DNA 複製、修復等におけるリガーゼとポリメラーゼとの密接な協同作用機構が示唆された。

次に申請者は、別に Nagata ら (1974) が分離した大腸菌 DNA リガーゼの、アンバー条件致死性変異株の詳細な解析を行なった。この変異株は、大腸菌 DNA リガーゼ構造遺伝子 (*lig*) にアンバー型のナセンス変異を起したもので、アンバー抑制遺伝子によって再活性化された時にのみ活性あるリガーゼを生産し、細胞の生存を可能ならしめる。抑制されない時には、DNA が崩壊して細胞は死滅する。申請者はこの崩壊過程を綿密に解析し、その初期過程で鋳型鎖 DNA に切れ目が入ること、新生 DNA 短鎖 (岡崎断片) の連結が完全に阻害されること等の重要な発見を行い、DNA 複製における DNA リガーゼの必須性を証明するとともに、この酵素の基本的な役割に関する新しい可能性を提起した。

主論文、参考論文を通じて申請者は、細胞の遺伝物質である高分子 DNA の複製、修復、組換え、突然変異等、広範囲の分子機構の解明を目指し、確立された既存の分子遺伝学的手法はすべて完全に駆使するのみならず、数多くの独創的な手法の開発と概念の導入を試み、この分野に大きく寄与した。

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。