

氏 名	酒 井 裕 さか い ひろし
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 192 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 49 年 11 月 25 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 Temperature-sensitivity in Initiation of Host DNA Replication and $\phi \times 174$ DNA Synthesis in <i>E. coli</i> HF4704S (大腸菌 HF4704S 内における宿主 DNA 複製の開始ならびに $\phi \times 174$ DNA 合成における温度感受性に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 駒 野 徹 教 授 緒 方 浩 一 教 授 松 下 雪 郎

論 文 内 容 の 要 旨

DNA の複製とその制御機構を解明すべく、大腸菌を用い、DNA 複製開始機構に関する一連の研究を行なった。

著者はまず大腸菌 C 株 (HF4704) から新しい DNA 複製温度感受性変異株 HF4704S を分離した。HF4704S 株は、培養温度 27°C では DNA 合成は正常であり、43°C に上げると DNA 合成は徐々に停止した。この間の DNA 量の増加は 40~50% であった。43°C で停止した DNA 合成は、培養温度を 27°C に下げると約 50 分後に回復し、DNA 複製と細胞分裂とが同調的に進行した。この条件下で行なわれる DNA 複製は、通常の複製起点から始まっており、したがって HF4704S 株では 43°C で DNA 複製の開始過程が阻害されている変異株であることが示された。従来、DNA 複製開始のための必須前提条件として、30 μ g/ml のクロラムフェニコールに感受性の過程が存在することが知られていたが、この過程と本研究において見いだされた過程とは同一である可能性があることが示唆された。

HF4704S 株において変異を起こしている遺伝子を大腸菌 K12 株に移し S1814 株を得た。有性生殖法およびファージ P1 形質導入法を用いて HF4704S 株と S1814 株の遺伝的解析を行なった結果、変異をおこしている遺伝子は染色体上において *thyA* の近傍に位置を占める新しい変異であることがわかり、これを *dnaH* と命名した。DNA 複製の開始過程を支配している 2 つの遺伝子としてこれまで *dnaA* および *dnaC* とが知られているが、*dnaH* はこれらのいずれとも異なっていた。

つぎに *dnaH* が *in vivo* および *in vitro* においてバクテリオファージ ϕ X174 DNA の複製にどのような影響を及ぼすかを明らかにした。

HF4704S 株を宿主とした ϕ X174 の増殖は、27°C では正常であったが、43°C で、宿主の DNA 合成が停止している条件下では阻害された。同じ条件下で、その DNA 合成を調べると、親 RF (複製型) は形成されたが、それ以後の DNA 合成 (子 RF の合成) は行なわれなかった。温度を 27°C に下げて *dnaH* 合成が回復してから ϕ X174 を感染させると、量的にはやや低いレベルではあるが、子 RF および 1 本

鎖 DNA 合成が行なわれた。

S1814 株の菌体粗抽出液中の DNA 合成活性を、 ϕ X174 DNA を鋳型とした DNA 合成系を用いて *in vitro* で調べた。その粗抽出液は 25°C では DNA 合成活性を保持しているが、43°C でプレインキュベートすることによって不可逆的に活性を失った。ここに検出された DNA 合成における温度感受性は、変異を起こしている *dnaH* 遺伝子の産物が不可逆的に不活性化したことによることが示唆され、したがって *dnaH* の支配を受ける宿主機能が、 ϕ X174 の親 RF から子 RF への *in vivo* および *in vitro* の合成に必須であることが示された。

論文審査の結果の要旨

大腸菌の DNA 複製開始機構を解明すべく、(1)大腸菌 C 株 (HF4704) から新しい DNA 合成温度感受性変異株 HF4704 S を分離し、(2) この変異の遺伝子上の座位を決定して *dnaH* と命名し、(3) *dnaH* の *in vivo* における役割を明らかにするためにファージ ϕ X174 を感染させ、HF4704 S 株における ϕ X174 DNA の複製様式を検討し、さらに(4) *in vitro* における *dnaH* 産物の役割を知るために ϕ X174 DNA を鋳型とする合成系においての作用を検討した。

その結果、(1) HF4704 S 株は培養温度を 43°C に上げると約 1 時間の間に DNA 合成は徐々に停止し、停止した DNA 合成能は 27°C に下げると約 50 分後に回復した。また、この機能は 30 μ g/ml のクロラムフェニコールに感受性であった。DNA の密度標識法による研究などから、DNA 合成の回復は通常の複製起点から始まっている。

(2) この変異を大腸菌 K12 株に移し、S1814 株を得た。

HF4704 S 株および S1814 株の遺伝解析を有性生殖法および形質導入法で行なった結果、この変異は *thyA* の近傍に位置し、これまで知られている DNA 合成開始因子 *dnaA* および *dnaC* とは異なる座位に位置することが明らかとなり、この変異を *dnaH* と命名した。

(3) HF4704 S 株にファージ ϕ X174 を感染させ、ファージ ϕ X174 DNA の合成の様相を調べたところ、HF4704 S 株の DNA 合成と同様に、27°C では正常に合成されたが、43°C では 1 本鎖環状 DNA が 2 本鎖 DNA (親 RF; 複製型) にまでしか合成されず、2 本鎖 DNA の複製 (子 RF 合成) は行なわれなかった。培養温度を 43°C から 27°C に移すと合成の回復が見られた。

(4) S1814 株の菌体粗抽出液による ϕ X174 DNA を鋳型とする DNA 合成活性の温度依存性を調べたところ、27°C では正常であったが、43°C では不可逆的に失活した。27°C における生成物は 2 本鎖環状 DNA であったが、43°C における生成物は鋳型 DNA の回収にとどまった。

このように DNA 合成開始因子 *dnaH* は大腸菌の DNA 合成因子の 1 として必須であるばかりでなく、大腸菌を宿主とするファージ ϕ X174 DNA の合成に関してもまた必須であることが明らかとなった。

以上のように本研究は DNA 複製開始機構に関し、重要な基礎的知見を与えるもので、生化学、微生物学、細胞生化学の分野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。