

氏 名 藤 田 泰 太 郎
 学位の種類 農 学 博 士
 学位記番号 農 博 第 182 号
 学位授与の日付 昭 和 49 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 農 芸 化 学 専 攻
 学位論文題目 **STUDIES ON DNA SYNTHESIZING ACTIVITIES
 IN GERMINATING SPORES OF *BACILLUS
 SUBTILIS***

(枯草菌の発芽期胞子における DNA 合成活性に関する研究)

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

DNA の合成反応には DNA ポリメラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ (DNase) や、DNA リガーゼ (joining enzyme) などの酵素群が複雑に関与し、その詳細な様相については不明な点が多い。本論文は枯草菌の発芽胞子を用いて、DNA の合成に関与するこれら酵素の活性発現の動態を追究して、枯草菌の発芽、分化の過程における DNA 合成の様相を明らかにした研究をまとめたものである。

I. 枯草菌栄養細胞の DNA ポリメラーゼ活性

枯草菌の栄養細胞では細胞膜で DNA 複製が行われていることがわかっているので、まず膜画分を分離し、それに付随している DNA ポリメラーゼ活性を解析しようとした。

対数増殖期にある細胞を集め、緩衝液にけん濁し、リゾチームだけを用いる緩和な条件で溶菌し、この溶菌液を50%と10%との二層から成るショ糖積層上にのせ、低速で遠心した。すると細胞膜画分の両層の界面に、また、上清は10%ショ糖積層上に集まる。この膜画分は DNA に富み、少量のタンパク質を含んでいる。パルスラベルによって、DNA 複製がこの画分で行なわれていることがわかった。この画分に存在する DNA ポリメラーゼ活性は、未変性 DNA を有効な鋳型とするが、熱変性 DNA は有効でない。これは上清画分の活性と異なる点である。このらの事実は大腸菌について明らかにされている膜画分の活性の特徴と類似しており、この活性は DNA 複製に関与していると考えられる。一方、上清画分の活性は DNA 修復活性と関係があるものと推測される。

II. 発芽期の胞子の DNA 複製活性

胞子の発芽期には、後期において初めて DNA 合成が起こり、また同調して栄養細胞になるので解析が容易となる。そこで細胞膜に存在する DNA 複製活性について、胞子発芽のときの活性変動をしらべ、DNA 複製の様相を追究した。

まず、Schaeffer の培地で30時間枯草菌を培養し、胞子を形成させたのち、混在する栄養細胞を溶菌させ、胞子だけを調製する。この胞子を Demain の培地で発芽させ、集菌し、0.5% Brij 58で37°C、15分

間の処理をすると、細胞膜は dXTP (X=A, G, C, T) に対して透過性を示した。そこで、この細胞を用いて H^3 -dXTP の取り込み活性を DNA ポリメラーゼアッセイ系で測定して、この活性の性質を明らかにし、さらに、発芽との関連性に、いろいろの条件下でしらべた。

その結果、枯草菌の発芽の際には DNA 複製活性が誘導され、また、この活性にはクロラムフェニコールの存在下で抑制されるタンパク質合成の過程が関与していることが明らかとなった。この活性は DNA 合成酵素そのものであると見ることができる。

Ⅲ. 発芽期の胞子の DNA 修復機構

クロラムフェニコール存在下で発芽させた胞子では ^3H -dXTP の取り込み活性がきわめて低いが、紫外線や γ 線を照射すると、取り込み活性が誘導される。これは DNA 修復活性と見なされるので、それについての解析を行なった。

1) Semi *in vitro* の DNA 修復

発芽胞子を Brij 58 で処理し、これに紫外線を照射して、その影響をしらべたところ、照射によって DNA は低分子化するが、これを DNA ポリメラーゼアッセイ系および NAD とともにインキュベートすると、もとの DNA の大きさに戻る。不完全な反応系では再結合は完全でない。このことは、DNA 修復に DNA ポリメラーゼ I と DNA リガーゼとが関与していることを示している。

2) 紫外線損傷 DNA の修復

発芽胞子に紫外線を照射すると DNA が損傷を受け、その損傷部の除去と修復合成とに DNA ポリメラーゼ I が関与することを明らかにした。このとき除去される DNA の大きさは、ほぼ 16 塩基対ぐらいであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

1950年代の半ばに Kornberg によって生合成された DNA は、その後、生物活性をもたないことが指摘され、ここ数年来、DNA の生合成に関する再検討が盛んに行なわれてきている。その結果、明らかにされたことは、DNA の合成反応は DNA の複製と修復とに大別され、この両者の反応には、DNA ポリメラーゼ、DNase や DNA リガーゼなどの多くの酵素群が関与する複雑な過程から成るということである。さらに最近には DNA ポリメラーゼに I, II, III, の 3 種類が存在することも示唆されてきているが、DNA 合成の際に作動するこれら酵素群の様相、役割などについては詳細にはわかっていない。本研究は枯草菌発芽胞子を用いて DNA 合成に関与する酵素群の動態を追究し、分化における DNA 合成の生化学的意義の一端を解明したものである。

著者は、まず、枯草菌の栄養細胞から膜画分に存在する DNA ポリメラーゼ活性と他のポリメラーゼ活性とを分離することに成功した。ついで、発芽胞子が初期には DNA 合成活性をもたないことに着目し、これを Brij 58 で処理して DNA ポリメラーゼ基質としての dXTP 透過性を付与して、この系は細胞内の反応をしらべるのに適切であることを示した。

この透過性発芽胞子を用いて、細胞内における DNA 複製活性と修復活性との動態を追究した。その結果、DNA 複製活性は発芽の過程で誘導されること、また、この活性は発芽の過程で合成される DNA

ポリメラーゼⅢの可能性あることを明らかにした。

さらに、発芽胞子における DNA 修復活性には、胞子内に既存するポリメラーゼⅠが関与することを明らかにするとともに、この DNA 修復には新たなタンパク質を必要としないことを示唆している。

このように本研究は分化と DNA 合成との関連性の一端を初めて立証したもので、生化学や分子生物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。