

氏 名	野 村 信 夫 の ひら のぶ お
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 519 号
学位授与の日付	昭 和 53 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 生 物 物 理 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	形質導入 fd ファージの研究

論文調査委員 (主査) 教授 高 浪 満 教授 小 関 治 男 教授 由 良 隆

論 文 内 容 の 要 旨

多くの薬剤耐性遺伝子は、トランスポゾンと呼ばれる末端にくり返しの塩基配列をもち転移可能な DNA セグメント上に存在することが知られている。トランスポゾンがある遺伝子の中に挿入された場合にはその遺伝子を失活させるので、この性質を利用すれば、遺伝子の位置や機能を解析することができる。またプラスミドやバクテリオファージに転移させれば遺伝的選択マーカーとすることができる。トランスポゾンには多数の種類が存在することが知られているが、その構造や特性についてはまだ充分な知見は得られていない。

申請者は、環状一本鎖 DNA をゲノムとする大腸菌ファージ fd にカナマイシントランスポソンを挿入し構造上の特性を解析することを試みた。方法として、薬剤耐性因子 R6—5 由来のカナマイシン抵抗性遺伝子 (kan 遺伝子) を組込んだプラスミド pML21 をもつ細菌のなかで fd ファージを増殖させ、そのなかから kan 遺伝子を形質導入するファージ fd-kan を分離した。独立に分離した16ケの fd-kan ファージはいずれも野生型 fd ファージの1.5倍の長さをもつ繊維状構造を有し、形質導入能は抗 fd ファージ血清により失活した。また細胞内から fd ファージの増殖型 (RF) DNA の1.5倍の長さをもつ fd-kan RF DNA が分離された。この DNA 分子はカナマイシン形質転換能をもち、またこの DNA と fd DNA との異種二本鎖分子を電子顕微鏡下で観察すると両端に逆位した相同な塩基配列をもつトランスポゾンに特徴的な構造がみられ、相同な領域の長さは1,000 塩基と測定された。なおこのトランスポソンは Tn 903と命名されている。この fd-kan RF DNA を各種制限酵素で分解し、生じた分解産物を解析して、Kan-トランスポソンの挿入部位は分離した fd-kan によりすべて異なることを明らかにした。このことはこのトランスポソンの転移の特異性がかなり低いことを意味する。fd-kan DNA を F⁻ 菌に形質転換すると安定なプラスミド (RF型) として存在するが、この菌に F 因子を移すとある頻度で野生型のファージが生成することが観察された。このことは F 因子に依存してトランスポソンが挿入された部位から切り出されることを示している。

fd ファージは環状一本鎖 DNA にコート蛋白質が結合して 繊維状構造をとったファージであり、DNA の長さに応じて種々の長さのファージを形成することが知られている。fd-kan が分離されたことは、fd ファージが挿入 DNA の長さに制限を受けない形質導入ファージとして使用できることを示している。fd-kan DNA は kan 遺伝子領域に制限酵素 R・Hind III で切断点を一ヶ所有する。したがって、R・Hind III で切断して異種の DNA を挿入することにより、挿入部位を一本鎖 DNA として取り出すことが可能なベクターとすることができる。またこの研究で薬剤耐性因子 R6—5 由来の Kan—トランスポーソンの切断点地図を作製し 9 つの fd-kan についてトランスポーソンの挿入位置を決定したので、トランスポーソンの構造や挿入の特異性を塩基配列レベルで決定することが可能になった。

論文審査の結果の要旨

申請論文は、カナマイシン抵抗性遺伝子をもつ DNA セグメント (カナマイシン・トランスポーソン) を挿入した大腸菌ファージ fd を分離し、その構造並びに特性を解析したものである。

fd ファージは環状一本鎖 DNA をゲノムとする繊維状ファージであるが、申請者はこのファージを薬剤耐性因子 R6—5 由来のカナマイシン抵抗性遺伝子を組込んだプラスミド pML 21 をもつ細菌のなかで増殖させ、カナマイシン抵抗性を形質導入するファージを分離した。独立に 16 ヶの形質導入ファージを分離したが、いずれも野生型の fd ファージよりもファージとして約 50%、DNA にして 3,100 塩基長く、電子顕微鏡による解析結果と併せて、両端に 1,000 塩基の逆位した相同な塩基配列を有するトランスポーソンとして fd ファージにカナマイシン抵抗性遺伝子が挿入されていることを明らかにした。これらの形質導入ファージは細胞中で増殖型の環状二本鎖 DNA を形成するので、この増殖型 DNA を各種の制限エンドヌクレアーゼで切断するという方法により、トランスポーソンの構造、並びに挿入部位の解析をおこなった。その結果、独立に分離したカナマイシン形質導入ファージはいずれも fd ファージ DNA の異なった部位にトランスポーソンの挿入がおこったものであることを明らかにした。更に F⁺ 菌のなかではある頻度で挿入されたトランスポーソンの切り出しがおこり野生型 fd ファージを生成すること、F⁻ 菌のなかでは安定なプラスミドとして存在すること、などを明らかにした。

fd ファージは DNA の長さに応じて種々の長さのファージ粒子を形成することが知られている。したがってこの研究は、fd ファージを挿入 DNA の長さに制限をうけない形質導入ファージとして、また挿入した領域を一本鎖 DNA として取り出すのに適したベクターとして使用できることを示したものである。また制限エンドヌクレアーゼによる挿入領域の切断点地図を作製したことにより、R6—5 由来のカナマイシン・トランスポーソンの一次構造の決定、並びにその挿入の特異性の解析を可能にした。トランスポーソンの切り出しにより野生型ファージを生成することから、この系がトランスポーソンの転移機構の解析に用いることができることを示したことも重要な知見である。

以上、申請者の研究はこの分野の研究の進展に寄与するところ多大である。

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。