

氏 名	三 木 徹 み き とおる
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	論 理 博 第 649 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Genetic and Physical Analyses of the Replication Origin and <u>dnaA</u> Gene of the <u>Escherichia coli</u> Chromosome by Molecular Cloning and Cleavage Mapping with Restriction Endonucleases (分子クローニングと制限酵素地図作成による大腸菌染色体の複製起点と <u>dnaA</u> 遺伝子の分子遺伝学的解析) (主 査)
論文調査委員	教 授 由 良 隆 教 授 小 関 治 男 教 授 高 浪 満

論 文 内 容 の 要 旨

細菌細胞特に大腸菌における染色体 DNA の複製に関しては、近年広範な生化学的および遺伝学的研究が行なわれてきた。しかし DNA 複製調節の観点から最も重要と思われる複製の開始機構に関する研究は、ほとんどウイルス、プラスミドなどに限られてきた。その最大の理由は、細菌染色体がこれらの自己増殖性因子に較べて非常に大きいということにある。もし染色体を小型化して細胞内で一種のプラスミドとして複製させることができれば、それらを用いて染色体の複製開始機構の研究を飛躍的に発展させることも可能になる。この様な考えから、この論文では大腸菌染色体の複製起点 (oriC) をもつ小型の自己増殖性プラスミドの分離を試みた。

先づ oriC の存在が示唆された染色体領域にある幾つかの大腸菌遺伝子の相対的位置を正確に決定し、続いてこの領域の染色体断片を運ぶ特殊形質導入ラムダファージを遺伝学的手法を用いて多数分離した。そのうちの 1 株 λ asn-5 が oriC をもつことを示唆する結果を得たので、このファージ DNA の制限酵素による切断地図を作製し、その地図上に幾つかの遺伝子の位置を決定した。さらにこのファージ DNA より、試験管内組み換えの手法を用いて、ラムダファージの複製起点を含まず、oriC を使って複製すると考えられるプラスミドを作製した。このプラスミド由来の DNA 断片を小型 F 因子 DNA 中に挿入し、F 因子が複製できない条件下でも複製しうるプラスミドとして oriC をもった小型 F 因子を分離した。これらのプラスミドを各種制限酵素で切断した後再結合し、oriC を保持し F 因子由来の複製起点を欠失した多くの変異体を得て、それらの構造を解析することにより、oriC の位置を約 450 塩基対の小領域内に決定した。この領域は大腸菌染色体地図上で約 82.5 分の位置、すなわちアスパラギン合成に関与する遺伝子 (asn) の極めて近傍にある。この結果に基づき、さらに oriC を含む短い DNA 断片を、1 細胞内に多数存在しうるプラスミド pBR322 を用いてクローン化した。oriC を唯一の複製起点としてもつプラスミドは不安定で、宿主大腸菌の増殖に伴いプラスミドを持たない細胞を多数生ずる。この性質は貧栄養培地を用いる程顕著であり、恐らくこの様な条件では染色体の複製開始頻度が低いことを反映するものと

思われる。

なお今回分離した形質導入ファージの中に、染色体複製開始に関与する遺伝子の1つとして知られている *dnaA* 遺伝子を運ぶものがあり、これを用いて *dnaA* 領域の制限酵素切断地図を作製した。さらにこの遺伝子を pBR322 と結合させて得られたプラスミドの構造を解析することにより、制限酵素切断地図上に *dnaA* 遺伝子の位置を決定した。これらのクローン化された *oriC* と *dnaA* 遺伝子の利用は、その解析結果と共に染色体複製開始機構の研究に新しい局面を開くものと期待される。

論文審査の結果の要旨

遺伝物質としての染色体 DNA が自己複製という生命現象の最も基本的な特性をもつことは周知の事実である。しかし DNA 複製の様式特にその制御機構はまだ十分に解明されていない。

本論文では、細胞生物としてその分子遺伝学的解析が最も進んでいる大腸菌を用い、染色体 DNA の複製開始の機構を解明するために新しい糸口を見出す試みを行なっている。すなわち、大腸菌染色体 DNA の複製起点を含む短い DNA 断片を切り出して、自律的複製の可能なプラスミドとして細胞内に定着させるという試みを行ない、ほぼ所期の目的を達成した。

まず普遍形質導入法による遺伝子地図の作製、特殊形質導入ラムダファージの分離とその遺伝解析および超遠心分離解析など、分子遺伝学の基本的な手法を充分活用して成果をあげた。さらに制限酵素による DNA 切断や DNA リガーゼによる連結、アガロースゲル電気泳動法による解析、切断地図の作製、形質転換、分子クローニングなど最も新しい技術をも極めて有効に活用した。

その結果、大腸菌染色体 DNA の複製起点および複製開始に必須の *dnaA* 遺伝子が、プラスミドとしてクローン化され、これらを用いることにより、DNA 複製の制御機構の解明をめざす研究は、明らかに新しい発展段階を迎えたといえることができる。

同様の趣旨の研究は、国内外のいくつかの研究グループによって推進され、ほぼ同時期におのおの類似の成果を挙げたが、何れも相互補完的な実験結果を得ており、結果として本論文の業績に確固とした支持を与えることとなった。特に本論文の研究では、複製起点領域を切り出す操作において、これを先づ特殊形質導入ラムダファージとして分離した点に最大の特徴があり、類似の諸研究の中では最も穏やかな実験操作を行なって成功したために、人工的作為の介在する危険性が最大限に排除されているものと評価される。また、本論文の研究を遂行完成させた申請者は、その過程および結果において、分子遺伝学およびその関連分野における独立の研究者としての実力を充分に獲得したものと評価できる。

以上の審査の結果、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。