

氏 名	藤 原 剛 ふじ わら つよし
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 219 号
学位授与の日付	昭 和 50 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 DNA Polymerase Associated with Membrane of <i>Escherichia coli</i> (大腸菌の膜に結合した DNA 合成酵素に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 駒 野 徹 教 授 緒 方 浩 一 教 授 山 田 秀 明

論 文 内 容 の 要 旨

染色体の複製は多くの因子によって複雑な制御下に行われているが、中でも中心的役割をはたしているのが DNA 合成酵素である。

本論文は従来知られていた DNA 合成酵素のほかに、新しい DNA 合成酵素の存在を明らかにし、その性質について述べたものである。

対数増殖期の大腸菌 HF4704 をリソチーム-EDTA 処理によってスフェロプラストとし、これを0.2% Brij 58で溶菌し、溶菌液を40-55%のショ糖濃度勾配遠心にかけ、上清画分と膜画分とに分けた。上清画分には従来から知られていた DNA 合成酵素、すなわち DNA 合成酵素 I が存在していたが、膜画分にも種々の性質において DNA 合成酵素 I とは異なる DNA 合成活性の存在することを認めた。膜に結合している DNA 合成酵素は、この状態で二本鎖 DNA を鋳型として要求し、酵素活性は SH 基阻害剤に対して感受性であった。

この酵素を Triton X-100 により膜より可溶化し、DEAE-セルロースおよびホスホセルロースカラムクロマトグラフィーにより精製した。精製酵素はエンドヌクレアーゼ活性を含まず、一本鎖 DNA に特異的に働くエキソヌクレアーゼ活性を含んでいた。酵素は 1 M の食塩を含むグリセロール濃度勾配遠心では約 5.8 S を示し、分子量は約119,000と推定された。反応の至適 pH は7.2であり、酵素は Mg^{2+} を要求し、その至適濃度は5-10mM であった。酵素活性は0.3mM の PCMB または 3mM の NEM で完全に阻害された。種々の一価カチオンの影響を調べると、カチオンの濃度が0.1M以下では反応は促進されたが、0.1M 以上ではむしろ阻害された。酵素は45℃、10分間の加熱により容易に失活したが、DNA が共存すると安定性は増大した。このような性質は DNA 合成酵素 I と著しく異なることから DNA 合成酵素 II と呼ばれた。

DNA 合成酵素 II は 0.2M 以下の塩濃度に長時間おくと容易に会合してグリセロール濃度勾配遠心下で 10 S 以上に広く分布する不規則な会合体を形成する。5.8 S 成分を単量体と考えると、二量体から五量体

にわたる会合体を与えた。この会合には膜成分は関与していないが、DNA 分子はむしろ促進的であった。

DNA 合成酵素Ⅱの *in vitro* における機能を明らかにするため、大腸菌の未変性 DNA を鋳型としてデオキシプロモウラシル三リン酸を取り込ませる密度標識法により反応を行い、生成物を中性塩化セシウムの平衡沈降法で調べたところ、生成物はすべて軽い密度を示した。この結果から、DNA 合成酵素Ⅱは鋳型 DNA の短い切れ目、すなわちギャップを埋める働き (gap filling) をしているものと推定した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、大腸菌の染色体の複製に関する DNA 合成酵素のうち、特に膜に存在する新しい DNA 合成酵素についての研究結果をまとめたものである。

まず大腸菌 HF4704 株の膜に DNA 合成活性が存在することを明らかにするため、対数増殖期の菌体を集め、リソチーム-EDTA 処理によりスフェロプラストとし、これを 0.2% Brij 58 で溶菌した。溶菌液は 40-50% ショ糖濃度勾配遠心で上清画分と膜画分とに分離した。膜画分に、従来から知られていた DNA 合成酵素Ⅰ (上清酵素) とは異なる DNA 合成活性を示す酵素が存在することを認めた。膜に結合した状態でこの酵素は、二本鎖 DNA を鋳型として要求し、SH 基阻害剤で強く阻害されることがわかった。以下に述べる酵素化学的諸性質とから、本酵素が DNA 合成酵素Ⅱであることを明らかにした。

膜画分を Triton X-100 で処理して DNA 合成酵素Ⅱを可溶化し、DEAE-セルロースおよびホスホセルロースカラムクロマトグラフィーにより精製を行った。精製された DNA 合成酵素Ⅱは、一本鎖 DNA に対して特異的に作用するエキソスクレアーゼ活性を含んでいた。酵素は 1 M の食塩を含むグリセロール濃度勾配遠心で約 5.8 S を示し、分子量は約 119,000 と推定した。反応の至適 pH は 7.2 であり、反応には Mg^{2+} が必要で、その至適濃度は 5-10 mM であった。反応は 0.3 mM の PCMB や 3 mM の NEM で阻害された。また反応は 0.1 M 以下の濃度の種々の一価カチオンで活性化されたが、0.1 M 以上の濃度ではむしろ阻害された。本酵素は 45℃、10 分間の加熱で容易に失活したが、DNA を共存させると安定性が增大することなどが明らかになった。さらに本酵素は、0.2 M 以下の塩濃度で容易に会合し、グリセロール濃度勾配遠心で二量体から五量体まで存在することが明らかとなった。

DNA 合成酵素Ⅱの *in vitro* における機能を明らかにするために、大腸菌の未変性 DNA を鋳型としてデオキシプロモウラシル三リン酸を取り込ませる密度標識法による反応を行った。この反応の生成物の分析を中性の塩化セシウムの平衡沈降法で行ったところ、軽い密度のみを示す生成物が得られた。このことは、この酵素が *in vitro* では修復的に働いていることを示すもので、鋳型 DNA の短い切れ目、すなわち短いギャップを埋める働き (gap filling) をしていることが明らかになった。

以上のように本論文は大腸菌の膜に結合した新しい DNA 合成酵素Ⅱについて、その性質と反応機構を明らかにしたもので、核酸生化学、微生物生化学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。