

氏 名	横 山 昌 鶴 よこ やま よし つる
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 143 号
学位授与の日付	昭 和 47 年 1 月 24 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 THE MECHANISM OF DNA REPLICATION OF BACTERIOPHAGE ϕX174 (バクテリオファージ ϕ X174のDNA複製の機構に関する研究)

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

ϕ X174 は直径 $25\text{m}\mu$ の球形のファージで、その核酸部分は一本鎖 DNA であることが約10年前に明らかにされた。このファージが増殖するとき、DNA の複製は3段階に分れて起こることがわかっていたが、第3の段階すなわち二本鎖 DNARF II (RF の二本鎖のうち、一方だけが開環状のもの、この時期には viral DNA (十鎖) だけが開いている) から一本鎖の子ファージ DNA が合成されるとき機構はわかっていなかった。本論文はこれらの点を追求して、 ϕ X174 DNA の複製機構を解明した成果について論述したものである。

E. coli C_N 株に非溶菌変異株 ϕ X174am3 を感染させて30分後にリゾチーム-EDTA で溶菌し、えられた液を 5~20%中性シロ糖濃度勾配遠心法で分画し、RF II 成分を分離精製した。この RF II を pH 12.5 で変性させてアルカリ性シロ糖濃度勾配遠心法で環状の相補性 DNA と開環状の viral DNA (十鎖) とに分け、十鎖の 5' 末端を ^{32}P で標識した、この 5'-末端標識 DNA を子ウシすい臓の DNase と蛇毒ホスホジエステラーゼで加水分解してモノヌクレオチドとし、分解生成物をろ紙クロマトグラフ法で分離した。クロマトグラフ上の各モノヌクレオチドに相当するスポットの放射活性をガスフローカウンターで計測した結果、 ^{32}P のカウントの40%以上がデオキシシンチジル酸に検出され、残りのカウントは他の3種類のデオキシヌクレオチドにほぼ平均して存在することがわかった。この結果から、RF II の十鎖の 5'-末端すなわちファージ DNA の合成開始点はデオキシシンチジル酸であると結論される。

つぎにマイトマトシン C 処理によって DNA 合成を停止させた *E. coli* HF 4704 株 (*hcr*⁻, *thy*⁻) に ϕ X174am3 を感染させ、40分後に ^3H -チミンを $5\mu\text{Ci/ml}$ となるように加え、35秒間標識した後、非放射性チミンを大過剰に加えて ^3H -チミンを希釈した。この試料を冷却し、リゾチーム-EDTA で溶菌した後、DNA をフェノールで抽出した。これを中性シロ糖濃度勾配遠心にかけて RF II 成分を分離したのちアルカリで変性させ、ついで pH 12.5 でシロ糖濃度勾配遠心法で分画したところ、完全な長さのファージ DNA の他に 5-12S の範囲で沈降する DNA の存在することがわかった。この時期には RF II

分子中の開環 DNA はほとんどすべて十鎖であることから、この短い DNA は子ファージ DNA 合成の中間体と考えられる。一方、非感染菌からの DNA には ^3H -チミンのとりこみが見られず、5-12S 成分が全く検出されないことから考えると、この短い DNA は宿主菌の DNA に由来するものではない。また、より緩和な方法として pronase-SDS 法によって DNA を抽出すると、フェノール抽出の場合と同じ沈降パターンがえられるので、短い DNA は完成したファージ DNA の切断にもとづく断片ではありえない。さらに、この成分は精製した RF II を変性させたものからも同一パターンとしてえられたので、5-12S DNA は RF II に由来することは確実である。また、宿主菌の 70S 粒子から出たものでもない。

短い DNA 成分の生成量と時間との関係をしらべてみると、20~35秒間の標識では DNA にとりこまれた ^3H のカウントの50%以上が 5-12S DNA にみられたが、時間の経過とともに放射活性は完成した DNA に次第に多く現われてくる。さらに、5秒間と10秒間と標識を行なったところ、前者の場合に後者の場合よりも、より短い DNA の方に放射活性が高く現われた。これらの結果から、5-12S DNA は、子ファージ DNA が合成されるときの中間で、viral DNA の複製が行なわれるとき RF II 分子上で常にまず短い鎖長の DNA が合成され、ligase の作用によって次第に長い DNA へと合成され、ファージ DNA が完成されと考えられる。

このように短い DNA が中間体として存在する事実は Gilbert の提出した rolling circle model では説明できない。上述の実験結果は、*E. coli* DNA 合成に関する岡崎モデルのように、短い DNA 断片を通じて不連続的な合成が行なわれるという複製機構が、 ϕX174 DNA のような小型の DNA でもあてはまることを示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

1950年代の中頃 Kornberg らによって DNA の生合成が報告されてから数年たたずして、その合成機構に疑点がもたれ始めてきた。これに対して現在いくつかの DNA 生合成機構のモデルが提案されている。

バクテリオファージ ϕX174 は核酸部分が一本鎖 DNA であることで特異的であるが、ファージの増殖のとき、その DNA は三つの段階によって複製されることが知られていた。その最終段階では二本鎖の RF II から一本鎖の viral DNA が合成され、子ファージが完成されるが、RF II 上のどの点から、またどのようにして子ファージ DNA が合成されて行き、一本鎖が完成したときにどのようにして RF II から離れて行くかなどについては、全くわかっていなかった。著者の研究はこの過程を追求して DNA 生合成機構に対する疑問点を解明することに成功したものである。

著者はまず RF II 成分からアルカリ性 Σ 糖濃度勾配遠心法によって開環状の viral DNA を分離し、この DNA 鎖の 5'-末端がデオキシシチジル酸であることを初めて決定した。

つぎに DNA 合成を停止させた *E. coli* HF 4704株に $\phi\text{X174am3}$ を感染させた後、 ^3H -チミンの RF II 成分へのとりこみを行なわせ、これを中性 Σ 糖濃度勾配遠心法で分離した後、アルカリ変性し、さらに pH 12.5 で Σ 糖濃度勾配遠心法で分画したところ、5-12S の範囲で沈降する DNA の存在す

ることを発見した。これは完全な長さのファージ DNA (14S) よりも鎖長が短く、子ファージ DNA 合成の中間体であると結論した。そしてこの viral DNA の複製が行なわれるときに RF II 分子上でまず短い鎖長の DNA が合成され、ligase の作成によって次第に長い DNA へと合成されてファージ DNA が完成されるという機構を示し、DNA 合成の新しいモデルを提案している。これらの業績は高い評価を受けている。

このように本研究は核酸の化学と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。