The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Proteus mirabilis菌におけるR因子の複製, Relaxed Control下での研究
Author(s)	渡辺, 春美
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30008
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【28】

氏名・(本籍)	渡辺春美（わたなべ はるみ）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 1827 号
学位授与の日付	昭和 44 年 9 月 30 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	**Proteus mirabilis 菌におけるR因子の複製，Relaxed Control 下での研究**
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀男 (副査) 教授 富沢 純一　教授 松代 愛三

論文内容の要旨

細菌にはエピゾームと呼ばれる一群の遺伝因子が存在することが知られている。エピゾームは宿主細菌にとっては附随的存在であり，外部からは感染，或いは細胞接合によって獲得される。宿主細菌内では，菌のゲノムに組込まれて宿主細胞に同調して増殖する存在様式か，宿主染色体の増殖とは独立に細胞質中で自律的に増殖する存在様式かのいずれかをとりうる。溶原性ファージ，細菌の性決定因子（F），コリシン因子，多剤耐性因子（R），などがエピゾームの代表的なものとして知られているが，どのような発生起源をもつのか，又この染色体外遺伝要因がどのように増殖しているのかは，まだあまり詳しく判っていない。ここでは薬剤耐性因子(以下R因子)の*P. mirabilis* 菌中での複製に関しての研究結果を報告する。

R因子 NR_1 をもつ *Proteus mirabilis* 菌の DNA を CsCl 密度勾配遠心法をもちいて調べると染色体のグアニン・シトシン含量（以下 GC 含量）（40%）とは異る GC 含量をもつ satellite DNA がみられる。このR因子の DNA は 52%GC 含量 DNA 部分 (1.712g/cm^3) と 58%GC 含量 DNA 部分 (1.718g/cm^3) とからできている。しかもある状態で培養した exponential 期の *P. mirabilis* 細胞内では宿主染色体の約16%に相当するRの DNA 量が観察されることから，(NR_1 一個の分子量及び大きさは，まだはっきりとは算定されていないが染色体の約1.5%に相当する DNA と考えられている。）一細菌内に約10個のR因子が存在する。(relaxed replication control) と名づけられた。つまり一細胞分裂の間にR因子の複製は10回起る。）

R因子は薬剤耐性を示す遺伝情報をもつ部分 (r-determinant) と，これを他の細胞に移す役割をする部分 (Resistante Transfer Factor, RTF) とから出来ていると考えられている。この52%と58%という異った GC 含量をもつR因子の DNA にはどのような機能作業があるのであ

ろうか。NR_1 R 因子をもつ *P. mirabilis* を stab からとり出して薬剤を含まない栄養培地の中で培養した菌から抽出した DNA は satellite DNA バンドとして 52%GC 含量（以下52%R）を示すものしかみられないが，このR因子の DNA 部分を多量にあつめてみると 58%GC 含量（以下58%R）を示す DNA の存在がわずかにみられる。この菌を薬剤を添加した栄養培地中で長い間培養すると，最終的にはR因子の DNA は，この 58%R を示すものだけとなる。このように 58% R satellite DNA バンドが長時間薬剤存在下で培養した菌から抽出した DMA の中にみられることから，58%R は r-determinant に相当し，52%R は RTF でないかとの仮説がたてられる。52%Rの状態のときには satellite DNA は染色体の約3%量存在するが，さきにも述べたように58%Rの状態になると染色体の約16%量を示す。細胞内のコピーの数を一定と考えると，58%Rは52%Rの約6倍の大きさの DNA といえる。宿主染色体の GC 含量との差が大きいこと，又R因子の DNA が比較的大きいということを利用して殆んどのRが58% R となるような条件をもちいて *P. mirabilis* を宿主としてR因子の複製実験が進められた。

R因子 NR_1 の *P. mirabilis* 中における複製。

細胞質内で R 因子が自律的に増殖している場合その DNA の複製は全く宿主染色体の複製と同じリズムで進行するのかどうか。細菌の各成長段階における DNA を調べてみた。成長カーブを追い，その各々の点で抽出した DNA を CsCl 密度勾配遠心法で分析する。DNA の超遠心パタンからR因子 DNA と染色体 DNA との比を算出，% R-factor DNA（以下% R-DNA）としてあらわした。この% R-DNA は細菌の exponential 期では一定の数値（16%）を示すが，細菌が stationary 期にはいると増加しはじめ約6時間後には48%となりその増加がとまる。数回くり返した実験から，exponential 期に示す% R-DNA の数値，及び stationary 期6～10時間に示す% R-DNA の数値には大きな変更のあることが観察された（後述）が，その増加のパターンは同じであった。この% R-DNA の増加は，細菌染色体の複製が終ったあとでブロモウラシル（Bu）を加えるとR因子 DNA のみが Bu で特異的にラベルされることから，細菌の stationary 期で宿主染色体の複製が終ったのちにも引続いてR因子の DNA の複製がおこなわれていることを示す。

Stationry 期10時間で染色体あたり48%に相当する R-DNA（32コピー）をもつ菌を，再び exponential 期に移すと，この蓄積されたRのコピーはどのような行動をとるのだろうか。この菌培養液を stationary 期10時間後栄養培地で20倍に稀釈して，O. D. を追いながら継続的に稀釈しつづけ，細菌を初期 exponential期に保つと，稀釈後% R-DNA は時間と共に減少しはじめる。数時間後には，さきに exponential 期で示した% R-DNA の値まで減少していく。Stationary 期に継続しておこるR因子の複製のため48%と蓄積された% R-DNA が，菌を再び exponential 期にしつづけたときに減少する様子は $\frac{(48-15)+15\times2}{2}\fallingdotseq32\%\rightarrow\frac{(32-15)+15\times2}{2}\fallingdotseq24\%\rightarrow\frac{(24-15)+15\times2}{2}\fallingdotseq20\%$ というように，さきに exponential 期に示したR因子10コピー（15%に相当）が細胞分裂ごとに複製されて，蓄積されていた残りのRのコピーは単に娘細胞に稀釈されていく。

Stationary 期6時間で% R-DNA の増加がとまるのはR因子を合成していく前駆体がなくなったためではなく，他の調節機構が働いていることは，この期の細菌に新鮮な栄養培地を同量加えて再び stationary 期の状態を確立しても% R-DNA に増加がみられなかったことから証明される。

このR因子 NR_1 はどのような宿主の中でも relaxed replication control なのであろうか。NR_1 を ***E. coli*** W677 (GC 含量50%) に移すと，薬剤存在下で培養しても58%R部分の satellite バンドは消失する。しかもこの ***E. coli*** から再びR因子を ***P. mirabilis*** 菌に移し，薬剤存在下で培養すると58%Rが現れる。***E. coli*** とは異り，***P. mirabilis*** の中では NR_1-R 因子の複製には特別な調節機構があることがわかる。

実験に使われた菌株はチミン要求性変異株である。チミンを添加しない培地 (Penassay broth) では exponential 期でも少量ではあるが% R-DNA に増加がみられた。しかも stationary 期では% R-DNA は約2倍多く蓄積された。R 因子をもたない細菌を使って調べた結果，培養液中のチミンの濃度が引き金となって染色体の複製が早くとまり，しかもR因子の複製は引続いて行われる結果であることがわかった。

これらの現象は，エピゾームR因子が細菌中で宿主染色体とは全く異る複製・調節機構をもつことを示す。

論文の審査結果の要旨

渡辺君の論文は腸内細菌に多く見られる多剤耐性因子（R）を取扱ったもので，この因子は細菌同士の接合によりR因子をもつ菌からももたない菌へ移行することにより多くの抗生物質に対し同時に耐性をもつに至る。

しかしこれまでの研究は主として大腸菌，赤痢菌等について行われていたため，R因子の解析になお多くの疑問が残されていた。ところが同君は新らしく ***Proteus mirabilis*** という細菌を用い，この菌のもつ DNA のグアニン，シトシン量（以下 GC %とよぶ）とR因子のもつ DNA の GC %のの差異を利用して，CsCl 密度勾配遠心法によって分離するとR因子には52% GC 量をもつ DNA と58% GC 量をもつ DNA の2種類のあることが認められた。R因子をもつ ***P. mirabilis*** を薬剤を含まぬ培地で育てると 52%GC 量をもつR因子の DNA がほとんどその大部分をしめるが，薬剤添加の培地では 58%GC 量の R-DNA が大量に得られる。

同君は後者，すなわち 58%GC 量をもつ R-DNA に主眼をおき，細菌の成長期における染色体当りの R-DNA 量の変化を追究した。その結果細菌の成長が exponential 期にある場合は R-DNA 量も一定の数値を示すが，stationary 期にはいると R-DNA 量は急激に増加し，約6時間後には exponential 期の約2.5倍に達する。別に測定された ***Proteus*** 菌の染色体に含まれる DNA 量とこの R-DNA 量の比から計算すると細菌の染色体が1回分裂する間にR因子は10～15回の複製を行っていることがわかる。

ついで同君は抗生物質の一つであるクロラムフェニコール(CM)耐性の遺伝子をもつ R 因子は細菌の細胞質内で CM をアセチル CM に不活化する酵素を生産することを認めた。しかもその酵素活性は R-DNA 量の増減と平行することからいわゆる遺伝子の量的効果 (Gene dosage effect) のあることを証明した。

以上渡辺君の論文は従来解析の困難であったR因子の複製や酵素生産の機構を *P. mirabilis* という細菌を用いることにより初めて明らかにしたもので，現在医学的にも重要視されている多剤耐性因子の本体を解く上にも多大の貢献をしたものであり，理学博士の学位論文として十分価値あるものと認めた。