

Title	バクテリオファージラムダにおけるDAN複製に関する研究 “複製中のDNA分子における親DNA鎖と子DNA鎖の共有結合”
Author(s)	浅香, 純一郎
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30687
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

【 2 】

氏 名 ・ (本 籍)	あさ 浅 香 純 一 郎
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	第 2 4 5 8 号
学位授与の日付	昭 和 47 年 3 月 25 日
学位授与の要件	理学研究科生理学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	バクテリオファージラムダにおける DNA 複製に関する研究 “複製中の DNA 分子における親 DNA 鎖と子 DNA 鎖の共有結合”
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松代 愛三 (副査) 教 授 次田 皓 教 授 殿村 雄治 助教授 深沢 俊夫

論 文 内 容 の 要 旨

バクテリオファージラムダ (λ) の DNA は、分子量約 3×10^7 、全長 17μ 、約 50,000 ヌクレオチド対からなる二本鎖 DNA である。両端の 5' 末端が伸長し、「cohesive end」と呼ばれる一本鎖部分をつくる。両端は相補的で、塩基対間の水素結合により、分子は全体として環状をとる事ができる。大腸菌に感染後、この末端どうしはヌクレオチド結合で結ばれる。この段階までは宿主（大腸菌）由来の酵素だけで反応は進む。複製はこの環状構造をもった分子を基として、DNA 上の或る特定の領域から始るが、いったん始まってしまったあとは、しばらくの間大腸菌と類似した様式でもって進行する事が、ギリシャ文字 θ の形をした複製中の分子が観察された結果わかった。しかし複製の開始にあたって、DNA 上の特定の領域がいかなる機構によって認識され、その領域からどのような機構によって複製が開始されるのかわかっていない。複製の開始の段階で始めて λ の遺伝子の発現が必要となり、その場合宿主の細胞の中にラムダ由来と思われる或る種のエンドヌクレアーゼの活性が出現する事が、最近の研究で明らかになった。

本研究では複製の開始を制御している機構を明らかにする事を目的として、複製開始点における DNA の物理化学的構造を検討する為に実験を開始した。モデルはエンドヌクレアーゼによっておこる「DNA 鎖上の切断」と、その結果生じる「切れめの入った環状 DNA」(複製開始時の DNA) の存在を想定している。

実験は、軽い培地で調整された ^{32}P で標識した λ ファージを、 $(^{14}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及び H_2O が $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及び D_2O で置きかえられた重い培地で生育した大腸菌に、重い培地で感染させ、感染後 10 分の DNA を抽出し、塩化セシウム密度勾配遠心法で少し重い DNA を分離する事により、1 回目の複製が進行中の DNA 分子だけを調整した。この複製途中の DNA 分子の、ヌクレオチド間の水素結合をアルカリ処理で切断して、中和後再び塩化セシウム密度勾配遠心法で分析すると、本来軽いはずの親

DNA一本鎖の一部が、少し重い浮遊密度を持つ事がわかった。この事は親のDNA鎖の一部が、新しく合成された重いポリヌクレオチド鎖と、共有結合で結ばれている事を示している。この結合は、親のDNA二本鎖のうち γ 鎖の方に効率よく生じている事が、DNA二本鎖の各鎖に対するDNA-DNAハイブリダイゼーションの結果わかった。

1回目の複製途中のDNA分子から検出され、加うるに親DNAの二本鎖のうち一方の鎖に効率よく生成しているという非対称的性質を示すこの種の結合は、DNAの複製機構そのものから由来したと考えてよいと思われる。これらの事から環状構造を持つ親のDNAの γ 鎖上の切断点に、新しく合成されたヌクレオチドが結合する複製の開始の機構が考えられる。

論文の審査結果の要旨

浅香純一郎君の「バクテリオファージラムダにおけるDNA複製に関する研究」と題する論文は富沢・小川によって開発されたラムダファージの複製中の分子を集める方法を用いて複製中のDNA分子を集め、親DNA鎖と新たに合成された子DNA鎖の間にcovalentな結合があることを究明したものである。

従来ラムダファージと大腸菌のDNAは複製の機構が分子レベルで最も詳細に解明された材料である。そして何れも複製途上にあるものの分子型は θ 型をしていることが示されて来た。この θ 型のものを巧妙に集める方法として富沢・小川の方法がある。これは D_2O や ^{15}N -アンモニヤ等の重い培地中で生えた大腸菌に ^{32}P で標識したラムダファージを感染させ、DNAを抽出してCsCl密度勾配遠心を行うと、複製途中にあるラムダのDNAはLL（つまり二重鎖共軽い）の位置からずっと比重の重い方に尾をひいた場所に存在する。

同君はこのようにして分割した複製途上にあるDNAをアルカリ処理によって水素結合をはずし、covalent結合で連った状態にして、再びCsCl密度勾配遠心にかけることにより、親のDNA鎖の一部が新しく合成された子の重いポリヌクレオチド鎖とcovalent結合で結ばれていることを示した。更にこの結合は親のDNA二本鎖のうち γ 鎖の方に効率よく生成していることを、DNA二本鎖に対するDNA-DNAハイブリダイゼーション法によって確かめた。

この研究結果から環状構造を持つ親のDNAの γ 鎖上の特異的切断点——合成開始点——に、新しく合成された子のヌクレオチド鎖が結合して伸長していくという複製開始の機構を強く裏付けることができ、DNA合成の開始機構に新しい知見を与えたことになる。よって理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。