

Title	大腸菌におけるλファージの遺伝的普遍組換えに関する研究
Author(s)	升方, 久夫
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/32716
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	升 方 久 夫
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 5 0 8 2 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 9 月 30 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	大腸菌における λ ファージの遺伝的普遍組換えに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 松原 謙一 (副査) 教授 殿村 雄治 助教授 小川 英行

論 文 内 容 の 要 旨

遺伝的組換えは、ヒトから微生物まで、広く見い出され、いずれにおいてもDNA鎖の切断と再結合によっておこることが知られている。大腸菌を宿主とする λ ファージでは、組換えは、宿主の普遍組換え機構であるrec系と、 λ ファージの普遍組換え機構red系と、特別な部位で起こるint系で、おこなわれる。

これらのうち、普遍的組換えの機構を明らかにするため、私は、rec系、red系が、各々働いている条件下での組換えの中間体を分離し解析した。DNAを各々、BUと、 ^{32}P で標識した λ ファージを混合感染させ、中間密度をもつDNAを、塩化セシウム中での平衡密度勾配遠心によって精製した。これらのDNAについて、 λ ファージの殻にDNAを取り込ませるパッケージング系で生物活性を調べたところ、 rec^+ と red^+ の条件で得たDNAでは、産生したファージの各々20%と5%が組換え体であったが、 $\text{recA}^- \text{red}^-$ では、約0.1%であった。電子顕微鏡観察により、 rec^+ 、 red^+ 、および $\text{recA}^- \text{red}^-$ のいずれの場合にも、8の字型ダイマー分子がみられ、また rec^+ では、環状ダイマー分子が、 red^+ では、 σ 型分子が特徴的に、見出された。これらの形状から、可能な組換えのモデルを論じた。

また、この実験過程で、細胞内の λ DNAには、転写されたRNAと結合してR・ループ構造を持ったものが存在することを示した。

次に、より直接的な解析を行なう目的で、in vitroでの組換え反応検出系を開発した。変異を持つ λ DNAを相同DNAと共に、酵素分画と反応させ、そこで起こった組換え反応を、パッケージング系で、生物活性のあるファージとして、組換え反応を検出できる系を確立した。

この系を用いて、大腸菌の抽出液から組換え活性を検出し部分精製したところ、それは分子量 28000

ダルトンのエキソヌクレアーゼⅢと一致することが、わかった。反応産物には、部分的一本鎖(gap)を持つものや枝をもつものが、多数見られた。

また、精製した大腸菌のrecA蛋白質の組換えにおける関与を、上記の系で解析した。その結果、recA蛋白質は、gap構造や自由端のある二本鎖DNAを基質とし、Mg⁺⁺、ATPの存在下で、組換え体形成に直接関与することが明らかになった。またこの反応は、recA1変異蛋白質により著しく阻害された。線状DNAと環状DNAを基質とした時、反応産物は、 σ 型や α 型に2つのDNAが結合したものであり、結合部にループ構造のあるものも見られた。これらの結果から、recA蛋白質が、直接、組換え反応に関与していることが明らかとなった。

論文の審査結果の要旨

遺伝的組換えはヒトから微生物まで見出される基本的遺伝現象の一つである。その本質は遺伝子であるDNA分子が切断されそれが他の分子または他の部分と再結合する過程を含むものであることが明らかになって来つつある。

本研究は、その過程の分子機構を明らかにする目的で、先ず組換え途上にある中間体分子を分離解析することから行なわれた。 λ ファージを材料にその普遍的組換え系ごとに調べられた結果いづれの場合にも、二分子がある点で結合した形が見出され、その外にそれぞれの系に特有な構造体が見られて、各組換え系の機構を推定することが出来た。特にこの解析で重要と思われることは各組換え系に関与していると思われる既存の機能が全て欠損している状態でも、二つの分子が結合した構造体が見られたことである。しかしこの分子は、組換え機能がなければ組換え体ファージをつくれなことが明確になり、最も初期に形成される中間体である可能性がある。そしてこれは、今まで知られている組換え機能以外のものによっている。

それら新しい機能を探る意味で、二種DNAの結合を促進する因子の探索が、DNAパッケージグ系をアッセイ系として用いて行なわれた結果、エキソヌクレアーゼⅢがその役割の少なくとも一つを行なっていることが明らかにされた。この発見は、全く新しいもので、組換え機構の研究に新しい局面を開く可能性があり評価される。このエキソヌクレアーゼⅢが作用したDNAは、recAたんぱく質によって組換え頻度が上昇することも見出された。recAたんぱく質がどのような作用でその働きをするかが調べられた結果、ギャップ構造や自由端のある二本鎖DNAを基質とし、MgイオンとATPの存在下で働くことが明確になった。そして線状DNAと環状DNAが基質の場合には、線状DNAの末端から環状DNAに入り込んで行くことがわかり、反応産物が、 σ 型や α 型であることが明らかにされた。これらの結果は組換え機構の研究に新しく重要な知見をもたらしたものであり、理学博士の学位論文として十分価値のあるものと認める。