

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 放線菌プラスミドpSN22の複製機構の解析   |
| Author(s)    | 鈴木, 市郎  |
| Citation     |   |
| Issue Date   |   |
| Text Version | ETD   |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.11501/3129011">https://doi.org/10.11501/3129011</a> |
| DOI          | 10.11501/3129011  |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

|            |                             |          |          |
|------------|-----------------------------|----------|----------|
| 氏名         | 鈴木 市郎                       |          |          |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(工学)                      |          |          |
| 学位記番号      | 第 13112 号                   |          |          |
| 学位授与年月日    | 平成9年3月25日                   |          |          |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>工学研究科醸酵工学専攻 |          |          |
| 学位論文名      | 放線菌プラスミド pSN22の複製機構の解析      |          |          |
| 論文審査委員     | (主査)                        |          |          |
|            | 教授 吉田 敏臣                    |          |          |
|            | 教授 関 達治                     | 教授 山田 靖宙 | 教授 室岡 義勝 |
|            | 教授 今中 忠行                    | 教授 小林 昭雄 | 教授 卜部 格  |
|            | 教授 二井 将光                    | 教授 塩谷 捨明 | 教授 金谷 茂則 |
|            | 教授 菅 健一                     |          |          |

#### 論文内容の要旨

本論文は、放線菌細胞内において構造的・分配的に安定に保持されるプラスミドベクターの開発に必要な基礎的情報を得るために、放線菌由来プラスミド pSN22の複製機構を解明することを目的として行った一連の研究をまとめたもので、序章、4章および終章からなっている。

序章では pSN22を含めた放線菌プラスミドの複製機構に関する研究の現状について述べるとともに、本論文の目的について述べている。

第一章では、pSN22の複製時における一本鎖 DNA 中間体上の複製開始点、single strand origin (SSO) 領域を限定し、同領域について解析した結果を述べている。同定した SSO, *sso1*の領域内に、他の放線菌プラスミドの SSO 領域の DNA 塩基配列と高い相同性を示す、約170bp の配列を発見している。

第二章では、以前に報告された、pSN22の接合伝達遺伝子領域内の約0.5kbp の断片の持つ SSO 活性について解析した結果を述べている。この断片は pSN22の複製必須領域に対し、プラスミド上での向きとは逆に組み込まれたときに SSO 活性を示した。断片内には2つの SSO, *sso2*および *sso3*が存在し、これら SSO の DNA 塩基配列から予測されるステム・ループ構造上には、*Staphylococcus*等のプラスミドの SSO に見られる保存配列が存在することを示している。

第三章では、pSN22の二本鎖 DNA 時における複製開始点、double strand origin (DSO) 領域の DNA 塩基配列を調べた結果について述べている。同領域内に、pSN22が属するグラム陽性菌由来プラスミド pC194グループにおいて保存されたニッキング部位(プラスミドの持つ Rep タンパク質が DSO に結合した後、切れ目を入れる部位)の配列を発見したことを述べている。この配列内部に点突然変異を導入したところ、プラスミドの複製能が失われたことを述べている。

第四章では、SSO を持たないプラスミドが、宿主 *Streptomyces lividans* 内で複製し安定に保持される機構について解析し、他の原核生物における既知の機構と比較した結果を述べている。プラスミドの複製中間体一本鎖 DNA から二本鎖 DNA への複製が、SSO 非依存のプライマー合成によって開始され、その機構が *Escherichia coli* で “general priming” と呼ばれる機構と類似していることを、*S. lividans* の無細胞系抽出液を用いた *in vitro* での解析により示している。

終章では、以上の結果を要約し、本研究で得られた主たる結論を総括するとともに、将来の展望について述べている。

## 論文審査の結果の要旨

細胞質遺伝子プラスミドの複製機構を知ることは、遺伝形質の安定性解析や工業的優良株の育種において重要である。しかし、プラスミドの複製機構の解析は大腸菌など限られた細菌で研究されており、抗生物質生産等において工業的に重要な微生物である放線菌のプラスミドの複製については、わずかな知見しか得られておらずプラスミドベクターの開発が遅れている。本論文は、放線菌 *Streptomyces nigrifaciens* 由来の接合伝達プラスミド pSN22の複製について、分子生物学的手法を用いて解析を行ったものであり、以下に要約するように、いくつかの新しい事実を見出すとともに、二、三の重要な提案を行っている。

- (1) プラスミド pSN22がローリングサークル型の複製を行うことを確かめ、一本鎖プラスミドの複製開始点の領域限定を行い、その塩基配列の一次・二次構造を解析した。このような複製領域の詳細な解析は、放線菌プラスミドにおいてはじめてである。
- (2) さらに、二本鎖プラスミドの複製開始点におけるニッキング部位の塩基配列が、他のグラム陽性菌プラスミドの保存配列と異なるにも関わらず、その配列が複製に必須であることを、突然変異解析によりはじめて示した。
- (3) 放線菌の遺伝子操作に用いられる宿主として著名な *Streptomyces lividans* において、プラスミドは一本鎖時の複製開始点を欠く場合も複製できる。この時、複製開始のプライマー合成機構は、同じグラム陽性菌 *Staphylococcus aureus* でよく研究されている RNA ポリメラーゼによるものではなく、むしろグラム陰性菌 *E. coli* の general priming と呼ばれる機構と類似することを明らかにした。

以上のように、本論文は、放線菌プラスミドの複製機構に関する新しい提案を行っており、微生物学ならびに微生物遺伝学に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。