

# 枯草菌におけるDNA複製開始反応の遺伝生化学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4592">http://hdl.handle.net/2297/4592</a>

# 枯草菌における DNA 複製開始反応の遺伝生化学的研究

金沢大学がん研究所生物物理部 (主任: 吉川 寛教授)

犬塚 紀子

(昭和49年10月6日受付)

細菌の染色体は、連続した2本鎖のDNAからなり、細胞の増殖にともなって複製され娘細胞に分配されていく。細菌が環境の変化に適応して生きていくにはDNA合成においても、環境に応ずる機構がなければいけない。

即ち、DNA合成と世代時間、細胞分裂の間には密接な関係が必要である。これらの間の制御機構については、これまでいくつかの点が明らかになっている。

1. DNA複製の継続反応に要する時間は一定である<sup>1)</sup>。
2. 細胞当りのDNA合成速度は複製開始の頻度によって決定される<sup>2)~4)</sup>。
3. 既に始まった複製の継続には蛋白合成を必要としないが複製の開始に蛋白合成を必要とする<sup>5)6)</sup>。
4. 複製開始の頻度は世代時間に依存する(に等しい)<sup>7)</sup>。
5. 細胞分裂は複製の継続反応の終了後一定時間経過して起る<sup>7)</sup>。

この様にDNA複製開始反応はDNA合成の調節に重要な役割を果たしているばかりでなく、細胞増殖の調節にも密接に関与している。

複製開始反応の素過程とそれに関係する因子については、これまでに遺伝的方法及び生化学的方法によって、徐々に解明されつつある。大腸菌においては複製開始に関与する遺伝因子として3種類が存在する事が明らかになっている<sup>8)9)</sup>。またLarkらはアミノ酸飢餓の方法でDNA複製を同調させその後の複製開始に及ぼす阻害剤の効果から2種類の蛋白質<sup>10)</sup>とRNA<sup>11)</sup>の関与を明らかにしている。

複製開始反応そのものの解析としては、 $\phi \times 174$ を用いて、より実体解明に近づきつつある。 $\phi \times 174$ ではin vitroで複製開始を行わせる事ができ<sup>12)</sup>、さらにその系を用いて、複製開始に関与する遺伝子産物の complementation が可能となった<sup>13)</sup>。小レプリ

コンの方がより単純で、開始反応に含まれる因子の機能を知るには有利であろう。しかしDNA複製の細胞増殖や細胞分裂とのかかわりあい等の問題は細胞に固有の問題であり、細菌を用いてしか解明できない。

またDNA複製の素過程である開始反応、継続反応、完了反応はいずれも細胞表層と密接に関係している。複製点、複製開始点、複製終点が細胞表層に結合している事実<sup>14)15)</sup>があるばかりでなく、Helmstetterらは複製開始に細胞表層の合成が必要である事を明らかにし<sup>16)</sup>、またRyterらも複製開始と局所的な表層合成が密接に関係している事を報告している<sup>17)</sup>。細胞膜を場としての反応であり制御であるという意味でも細菌の系での追求が必要であろう。

筆者は遺伝的構造<sup>18)</sup>と複製様式<sup>19)</sup>が比較的良好に分っていて、また形質転換法<sup>20)</sup>の可能な枯草菌を用いて複製開始反応の遺伝的生化学的解析を行った。その結果、複製開始に関与する2~3種類の因子の存在とRNA合成の必要性が明らかになった。これら諸因子の合成と作用の時間的経過についても検討する。

## 実験材料および方法

### I. strains

*Bacillus subtilis* 168 (LTT)

genotype: *leu*, *thy*, *trp* C 2

tsMH27, ts6057, PEA<sup>S</sup>-11は168 (LTT) からニトロゲンアニジン処理<sup>21)</sup>により得られた。168 (TT) は168 (LTT) から、MH27 (TT) 6057 (TT) は、MH27, 6057から形質転換法<sup>20)</sup>より *leu*<sup>+</sup> トランスホーマントとして単離した。

*Bacillus subtilis* 168 (MU 8 U 5 U16U 2)

genotype: *leu* 8, *met* B 5, *Pur* A16, *his* A

### II. media

#### 1. Low phosphate Penassay (LP)

Penassay (Difco Antibiotic Medium 3) の phosphate を  $10^{-3}$ M に下げ、その代わりに Tris-HCl

Genetic and biochemical study on initiation of DNA replication in *Bacillus subtilis*. Noriko Inuzuka, Department of Biophysics (Director: Prof. H. Yoshikawa), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

buffer (pH 7.3) を最終濃度 0.1M 加えて調合した。

2. BHIプレート: BHI broth (Difco Brain Heart Infusion 18.5g/l H<sub>2</sub>O) 1l に Difco Bacto Agar 20g を加えた。

3. Cg<sup>22)</sup> (Spizizen's Minimal Medium) に 20種類のアミノ酸をそれぞれ 25 $\mu$ g/ml 加えた培地

4. C+GMII<sup>23)</sup>

### III. buffers

1. 1 $\times$ SSC: 0.15M NaCl, 0.015M Na<sub>2</sub>-citrate

2. TMK buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.1), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1M KCl)

### IV. 試薬

1. 5-ブロモデオキシウリジン (5-BudR) Sigma 製

2. <sup>32</sup>P-正リン酸 第一化学薬品株式会社製 (carrier free)

3. <sup>3</sup>H-チミジン (<sup>3</sup>H-TdR) New, England Nuclear (18.5Ci/mmol)

4. クロラムフェニコール (CM) Fark, Davis & Co.

5. リフエンピシリン (Rif) Lepetet Co.

6.  $\beta$ -フェネチルアルコール (PEA) 半井

### V. 実験方法

1. <sup>3</sup>H-TdR の取り込みによる DNA 合成量の測定法

<sup>3</sup>H-TdR (0.5 $\mu$ Ci/5 $\mu$ g TdR/ml) を含む LP 培地中でバクテリアを増殖させ、適時に採取した 0.5ml に KOH を最終濃度 1N になるように加え、37°C で一晩処理したのち、IN-HCl で中和した。これに 10% cold TCA (トリクロル酢酸) を加え、TCA 不溶性の分画を Glass fiber filter (Whatman 製 GF/C) 上に集め、トルエン・PPO シンチレーター (PPO 5g/l トルエン) を用いて、その放射能活性を測定した。

2. 形質転換法<sup>20)</sup>

3. DNA の抽出法

1) vegetative cell からの場合

培養液 10~20ml に 1M NaNO<sub>3</sub> を最終濃度 20mM に加え急速に氷冷した。低速遠心で菌体を集めた後、Saito & Miura の pH 9.0 フェール法<sup>24)</sup>により DNA を抽出し、0.2ml の 1 $\times$ SSC に溶解させ、形質転換の実験に用いた。

2) 孢子からの場合

Takahashi の方法<sup>25)</sup> による。

4. 遺伝子頻度測定法 (MFA)<sup>19)</sup>

pur A/met B 比を測定するには、168 (MU 8 U 5 U16U 2) (leu 8 metB purA hisA) を受容菌としてサンプル DNA、および 168LTT 孢子 DNA を用いて形質転換を行った。サンプル DNA を用いて得られた purA<sup>+</sup> transformants と metB<sup>+</sup> transformants の比を孢子 DNA を用いて得られた purA<sup>+</sup>/metB<sup>+</sup> 比で割って補正した。

5. purA/metB 比から per cent initiation の換算法。

ある培養条件下では、すべての細胞は DNA 複製を終了した状態で停っている。この条件を変えた時、新たに起る複製の再開始の頻度を測定する方法として、先ず、上述のようにして求めたサンプル DNA の purA/metB の値を孢子 DNA の同じ比で割り補正值を出す。ついでこの値が 1 の場合を per cent initiation  $\equiv$  0% とし、また 1 から 2 の間は  $(x-1) \times 100$  (%) とした。2 以上の場合は  $x/2 \times 100$  (%) として求めた。但し、x は測定するサンプル DNA の purA/metB 比を表わす。

6. 複製開始能力の測定法

5 と同様にある培養条件下で DNA 複製を終了した状態で停止させた後、この条件を変えた時複製の再開始が起るが、その時複製の継続反応は阻害しないで開始のみ阻害する処理をして、処理を始めた時点までに形成されていた複製再開始能力を測るには

1) 再開始後の purA/metB 比の経時変化から maximum の purA/metB 比を求めて、5 の方法で per cent initiation として算出するか、または

2) 再開始後の <sup>3</sup>H-TdR の取込み量の最大増加分 (%) を per cent initiation として測定した。

7. CsCl 密度勾配遠心法<sup>26)</sup>

5-BudR で density label した DNA を 0.5ml の 1 $\times$ SSC に溶かし、それに 1 $\times$ SSC に溶かした CsCl を加えて最終密度を 1.70、全容量を 4.7ml とした。Spinco SW 50.1 rotor で 23°C で 35,000 rpm、60 時間遠心した。遠心後、遠心管の底から 3 滴づつ分画し、各分画を 0.3ml の 1 $\times$ SSC で希釈した。このうち、0.1ml を分取し、DNA の放射能活性を測定し、また 0.05ml を用いて各遺伝子マーカーに対する形質転換活性を測定した。

## 実験結果

### I. DNA 複製開始変異株の単離

DNA 複製の開始反応を遺伝的、生化学的に解析するために、DNA 複製の開始に関する変異株を単

離することを試みた。この種の変異株は致死性であるので条件変異株を単離しなければならない。条件の設定にあたっては、複製開始に関与する蛋白質の変異を想定して高温感受性変異株を、また複製開始に関与する細胞膜の変異を想定して $\beta$ -フェネチルアルコール (PEA) 感受性変異株を単離した。PEAは細胞膜に特異的に作用し透過性を変化させると同時に適当な濃度では細胞の高分子生合成の中で DNA 合成のみが特異的に阻害されることが大腸菌で報告されている<sup>27)</sup>。これは細胞膜の DNA 合成に対する特異的機能を解析する上に有用な現象である。

単離方法としては、ニトロソグアニジン処理した細胞集団から、高温感受性変異株の場合には、30°Cで生えて48°Cで生えないコロニーを選択し、PEA感受性変異株の場合には、0.3%PEAを含むBHIに生えないコロニーを選択、単離した。

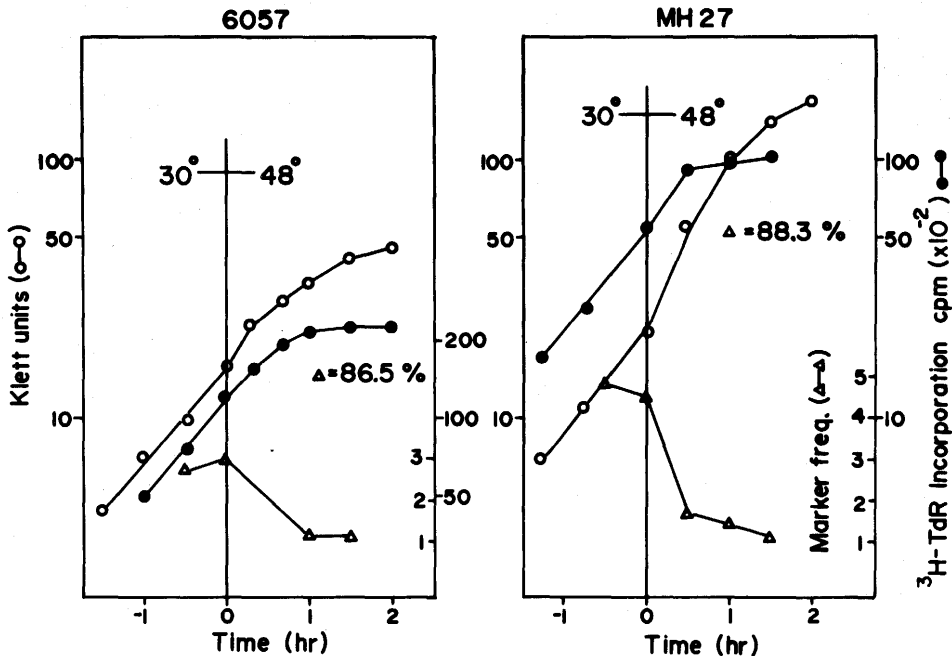
## II. DNA 複製開始変異株の同定

このようにして得られた高温感受性変異株の中から DNA 複製開始変異株を、次の2つの方法、1. アイソトープによる方法、2. 遺伝子頻度測定法により同定した。

### 1. アイソトープによる方法

細胞を<sup>3</sup>H-チミジンを含んだLP培地で30°Cで培養し、Klettが15~20に達した時、48°Cに移して培養を続けた。各時間にサンプリングして、<sup>3</sup>H-チミジンのDNAへの取り込み量を測定して、DNA合成の変化を調べた。その結果は、高温で、1) DNA合成が阻害されないもの、2) ただちにDNA合成がほとんど停止するもの(残存合成量0~20%)、3) DNA合成が選択的に阻害されるもの(残存合成量40~150%)に分類された。一方DNA複製開始が高温で阻害された場合、LP培地では理論的には86%の増加

図1 ts6057とtsMH27の増殖とDNA合成



細菌を<sup>3</sup>H-TdR (specific activity: 0.5 $\mu$ Ci/5 $\mu$ g TdR/ml)を含んだLP培地で、30°Cで培養し、Klettが15~20に達した時、培養液を48°Cに移して培養を続けた。温度をシフトする前と後、適時に0.5mlの培養液を採取して放射能活性を測定した。また同時に10~20mlの培養液を採取してDNAを抽出し、形質転換法によって purA/met B 比を測定した。

○—○：濁度，●—●：DNAに取込まれた<sup>3</sup>H-TdRのカウント  
△—△：purA/metB

が見込まれるので、目的とする複製開始変異株は上の分類の3)に属していると思われる。実際に、高温で80~100%の<sup>3</sup>H-チミジンの取込み量の増加が見られる変異株が4株単離された。図1はそのうちの2株(tsMH27とts6057)の菌の増殖(klett)とDNA合成の変化を示す。両株ともに、高温で80~90%のDNAの増加が観察され、複製開始変異株の場合の理論値と一致した。

しかし<sup>3</sup>H-TdRの取込み量だけでは、複製開始の変異株かまたは複製の継続反応の変異株かの区別はできないので、次に、それらの変異株について高温に移したのちの複製様式の変化を追求した。

2. 遺伝子頻度測定法<sup>19)</sup>

枯草菌では複製起点、複製中点および終点の各々に近い位置にある遺伝子が同定されており<sup>18)</sup>、細胞内のそれら遺伝子の頻度は抽出したDNAによる形質転

換活性を測定して容易に求めることができる。これら遺伝子頻度の相対比(起点/終点≡purA/metB, 起点/中点≡purA/hisA, 中点/終点≡hisA/metB)の値はDNA抽出時の細胞のDNA複製様式を直接反映している。変異株の高温に移す前と後の細胞からDNAを抽出し、形質転換法により、purA/metBの比を計測する。この比を両遺伝子を同じ頻度含む親株168LTTの孢子DNAのpurA/metBの比で補正する事によって試料DNAにおけるpurA/metBの比が算定できる。変異株を30°CでLP中で培養した時、purA/metB比は約4で、このことは染色体当たり3個の複製点を持つ事を表わしている。48°Cに移した後すぐにpurA/metB比は減少し始め1時間以内に1に近づいた(図1)。この結果は、48°Cでは複製開始反応のみが直ちに停止し、複製は正常に終点まで進行できる事を示していると思われる。即

図2 168(LTT) 野性株と(PEA<sup>S</sup>-11)の増殖とDNA合成

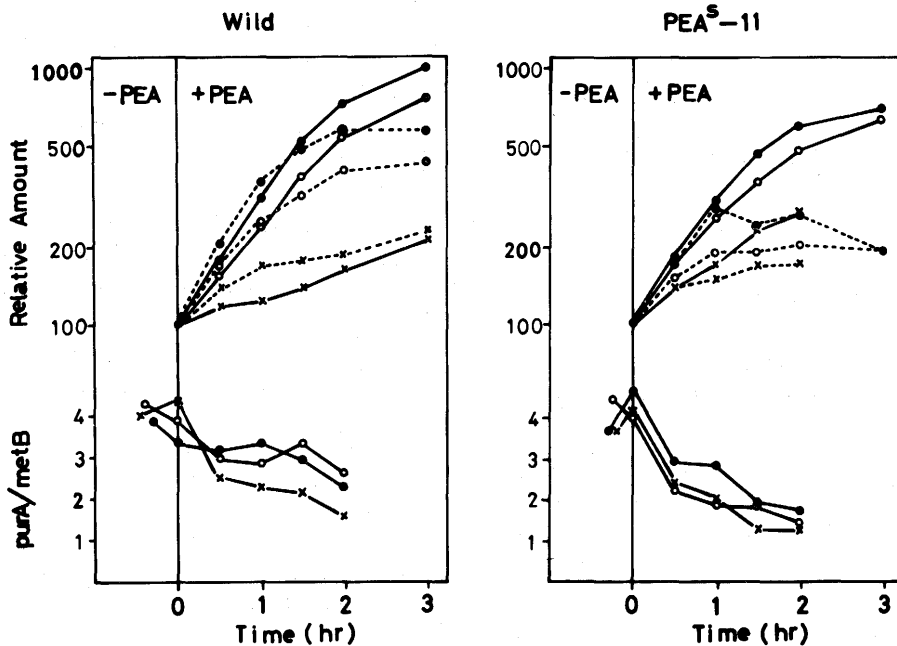


図1と同じように行った。但し培養温度は34°Cで行い、Klettが15~20に達した時、各濃度のPEAを加えた。

●—●, ○—○, ×—×:それぞれ0.1%, 0.2%, 0.3% PEA存在下での相対的濁度をPEA添加時のKlett値を100として表示した。また、下図は同濃度のPEA存在下で合成されたDNAのmetB/purBの比をそれぞれ示した。

●····●, ○····○, ×····×:それぞれ0.1%, 0.2%, 0.3% PEA存在下でDNAに取り込まれた<sup>3</sup>H-TdRのカウント数をPEA添加時のそれを100として表示した。

ち、遺伝子頻度測定による結果は先に述べた  $^3\text{H}$ -チミジンの取込みの結果とよく一致し、突然変異株 ts6057 と tsMH27 は染色体複製開始に必須の機能が特異的に高温感受性に変異しているものと思われる。

PEA 感受性変異株についても同様の方法によって同定した。野性株では図2に示す様に0.3% PEA によって菌の増殖も DNA 合成も同時に阻害される。DNA 合成のみを選択的に阻害する濃度は見つからなかった。そこで0.2% PEA に対し感受性の変異株を単離したが、その1株 (PEA<sup>s</sup>-11) は0.2% PEA 添加後、DNA は80~100%増加して止まり、さらに purA/metB 比は添加前には4であったが、添加後徐々に1に近づく事から、DNA 複製の開始反応が PEA 存在下で選択的に阻害されていると思われる (図2)。

### Ⅲ. 変異株の遺伝解析

上述の方法で複製開始変異株と同定された2株の高温感受性菌について、1. 同じ遺伝子上の変異か否か、2. 遺伝子地図上の変異した位置を調べた。

#### 1. ts6057 と tsMH27 の組換えテスト

tsMH27 (LTT) を受容菌として野性株 (TT) と ts6057 (TT) のDNA を用いて形質転換を行なった。生じた ts<sup>+</sup> トランスホーマントの数を leu<sup>+</sup> トランスホーマントの数で割る事により、用いた DNA の形質転換の効率を補正した。その結果野性株と ts6057 とは同じ補正值で、このことは、ts6057 と tsMH27 との間には、linkage は全くなく、両者は異なった遺伝子の変異株と思われる。さらに2つの変異株の変異した遺伝子が遺伝子地図上のどこに位置するかを調べた。

#### 2. ts6057 と tsMH27 のマッピング

枯草菌において、複製は purA 近傍の起点から

二方向<sup>28)</sup>に逐次的に起き、metB の近くで終了する事が知られている<sup>18)</sup>。また枯草菌の胞子は、複製が終了した段階で静止しており、発芽時には複製起点から同調して複製が開始される<sup>29)30)</sup>。そこで、発芽時の複製順序から未知の遺伝子と既知の遺伝子との相対的な位置を知る事ができる<sup>30)31)</sup>。実験方法で述べた様に野性株の胞子を発芽させ、複製開始後複製される DNA を 5-BudR で重くラベルし、複製された DNA (HL) と複製されていない軽い DNA (LL) と分けた。各分画の DNA を用いて ts6057, tsMH27 および遺伝子地図上の位置のわかっている遺伝子の変異株を受容菌に形質転換を行い、各遺伝子の複製率を調べた。表2に示された結果から ts6057 は purB の少し前 (起点に近い方) に、また tsMH27 は leu と his の間に位置することが明らかになった。この複製順序による方法からは、おおよその位置しかわからないのでさらに詳しく解析するには、形質転換又は形質導入によって関連した遺伝子を探索しなければならないが、両者ともまだ見つからない。一方 Karamata ら<sup>32)</sup>は枯草菌の複製開始変異株を2株 (dnaB と dnaD) 同定し、マッピングしていて、前者は leu 遺伝子と、dnaD は trp 遺伝子と関連していることを報告している。この報告は、tsMH27 と Gross らの dnaB とが同じ遺伝子の変異株である可能性を示唆するが、まだわかっていない。ts6057 は両者と異なり全く新しい変異株と思われる。

tsMH27, ts6057 両変異株の遺伝的解析により、複製開始反応に少なくとも2つの因子が関与していることが明らかになった。これらの因子の性質を明らかにする目的で、それぞれの変異株について、高温から低温に戻した時の複製再開始の解析を行なった。

表1 6057とMH27の組換えテスト

Recombination experiment		recipient: MH 27 (LTT)			
		donor DNA: wild (TTd), 6057 (TTd)			
	DNA	ts <sup>+</sup>	leu <sup>+</sup>	ts/leu	Normalized to wild
exp 1	wild(TTd)	233	851	0.274	1.00
	6057(TTd)	292	717	0.407	1.49
exp 2	wild(TTd)	184	752	0.245	1.00
	6057(TTd)	191	466	0.409	1.67

形質転換法によって行った。

表2 density transfer method によるマッピング

A

	Replication in BdUR	markers					total DNA
		purA	ts6057	purB	hisA	metB	
per cent replication	10 min	33.9	11.6	0.2	0.2	0.4	1
	40 min	55.0	31.5	10.3	2.9	1.4	9.0

B

	Replication in BdUR	markers				
		purA	hisA	tsMH27	leu8	metB
per cent replication	140 min	81.7	28.0	25.8	24.4	12.3

A :  $^{32}\text{P}$  で標識した(LTT)胞子(77cpm $^{32}\text{P}$ /10 $^6$ spore)をC + G M11中で37°C 3時間チミン飢餓培養を行った。その後、5-BudR(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を加え各時培養液を採取した。

B : 168 (LTT) 胞子を Cg+GM11中37°Cで90分チミン飢餓培養を行った。その後、5-BudR (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )と $^3\text{H}$ -TdR(0.5 $\mu\text{Ci}/1\mu\text{gTdR}/\text{ml}$ )とを同時に加えて培養し、各時培養液を採取した。A, Bそれぞれ同じように以下の操作を行った。低速遠心で細胞を集めた後、30% sucrose-TMK buffer (pH7.1)- lysozyme(1mg/ml) 溶液に懸濁し、プロトプラストを作らせた。プロトプラストから pH9.0フェノール法でDNAを抽出し、CsCl密度勾配遠心法によって重い分画(HL)と軽い分画(LL)に分画した。各分画の各遺伝子マーカーに対する形質転換活性を測定した。得られた形質転換活性から per cent replication を次式のように求めた。

$$\% \text{ replication} = \frac{\frac{1}{2} \text{HL( Transformants)}}{\frac{1}{2} \text{HL( Transformants)} + \text{LL( Transformants)}}$$

$$\text{total DNAの per cent replication} = \frac{\text{HL}(^{32}\text{p})}{\text{HL}(^{32}\text{p}) + \text{LL}(^{32}\text{p})}$$

#### IV. DNA複製再開の解析

##### 1. 30°Cに戻した際の DNA 合成とその複製起点について

ts6057 と tsMH27 を48°Cで1時間培養後低温に戻すと、lagの時間の差はあるが両者とも再びDNA合成を回復する(図3, 図4)。この時、purA/metB比は図4に示す様に1から2へさらに4へと変化する。これは高温で複製が終了していたのが低温で再び複製を開始したことを示唆する。しかしもっと直接的に複製の再開を証明する為、48°Cから30°Cに戻した後複製されるDNAを5-BudRで重くラベルし、染色体上の複製起点(purA)、中点(leu)、終点(metB)がCsCl密度勾配遠心分離パターンで軽い分画(LL)から重い分画(HL)に移る頻度(per cent replication)を調べた<sup>26)</sup>。図5はts60

57について、各マーカーの複製されていく時間的経過を示しているが、この結果は、30°Cに戻した場合、purA近傍の正常の複製起点から複製が開始し、逐次的に複製末端に向かって進行していることを示す。

即ち高温から低温に戻すことにより変異した機能が回復し、複製が再開される。そこでこの機能の回復に対する高分子合成阻害剤の効果を調べ、変異の性質を解析した。

##### 2. DNA複製再開に及ぼすCMとRifの効果

高温から低温に戻すと同時にCM(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を、または低温に戻す2分前にRif(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を加えて、蛋白質またはRNAの合成阻害がDNAの複製開始におよぼす効果を、 $^3\text{H}$ -TdRの取込みによって測定した。ts6057はCMによって $^3\text{H}$ -TdRの

図3 6057の30°Cに戻してからの複製再開に及ぼすCMの阻害効果

図1と同じ方法で48°Cで1時間培養後、2等分しその一方にのみCM(200 $\mu$ g/ml)を加え同じ specific activity の<sup>3</sup>H-TdRを含んだLpで2倍に希釈して直ちに30°Cに戻して培養した。30°Cに戻した時を0 timeとしてその時の<sup>3</sup>H-TdRの取込み量を100として表示した。

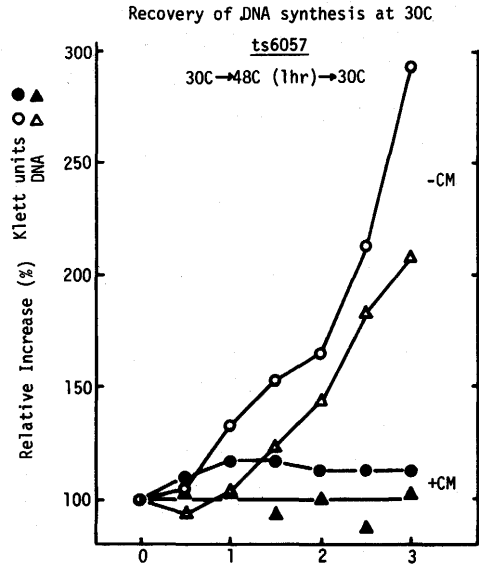


図4 MH27の30°Cに戻してからの複製再開に及ぼす Rif, CM の効果

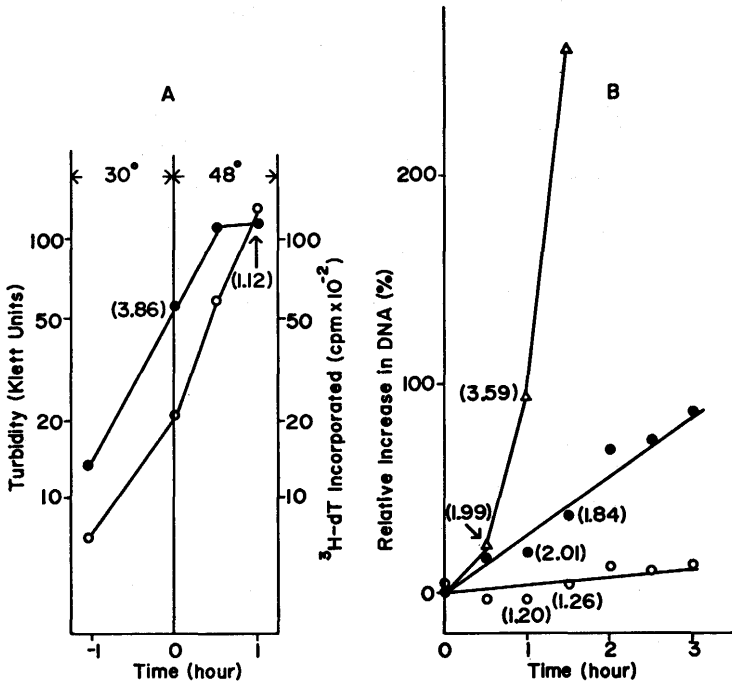


図3と同じ方法で行った。但し30°Cに戻す2分前に培養液を3等分して、その第1の培養液にRif(1 $\mu$ g/ml)を直ちにに加え、2分後に同じ濃度のRifを含んだLPで図3と同じように希釈して30°Cに戻し、培養を続けた。第2の分画にCM(100 $\mu$ g/ml)を30°Cに戻す時に加え、残りの培養液は薬剤無添加で30°Cで同様に培養した。

A: 30°Cに戻す前の菌の増殖(○—○)とDNA合成(●—●)  
 B: 30°Cに戻してからのDNAの増加分 △—△: 薬剤無添加,  
 ●—●: +CM, ○—○: +Rif  
 なお図中の数字は purA/metB 比を表わす。



図5 density transfer method による複製再開の解析

ts 6057 を  $^{32}\text{P}$  ( $1.5\mu\text{Ci/ml}$ ) を含んだ LP 培地で 4 世代以上培養して Klett が 20 に達した時,  $48^\circ\text{C}$  に移して培養し, 1 時間後 membrane filter ( $0.45\mu$ ) で濾過して集菌し, LP で洗い, 後 5-BudR ( $50\mu\text{g/ml}$ ) と  $^3\text{H-TdR}$  ( $0.5\mu\text{Ci/ml}$ ) を含んだ 2 倍容量の LP に懸濁して  $30^\circ\text{C}$  で培養した。その後適時 15ml を採取して DNA を抽出し, 実験方法に述べたようにして  $\text{CsCl}$  密度勾配遠心法を行なった。

Total DNA および各マーカーの % replication を表 2 の説明文中の式によって求め, 表示した。

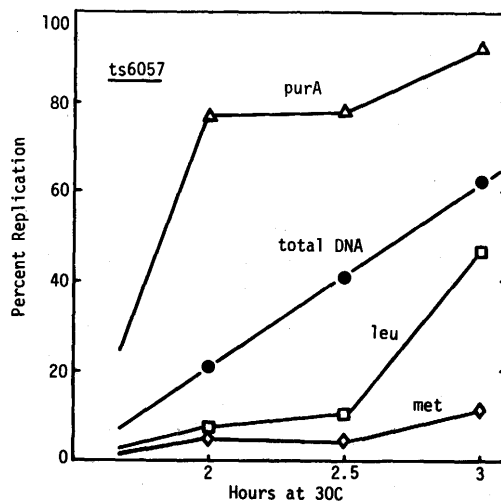
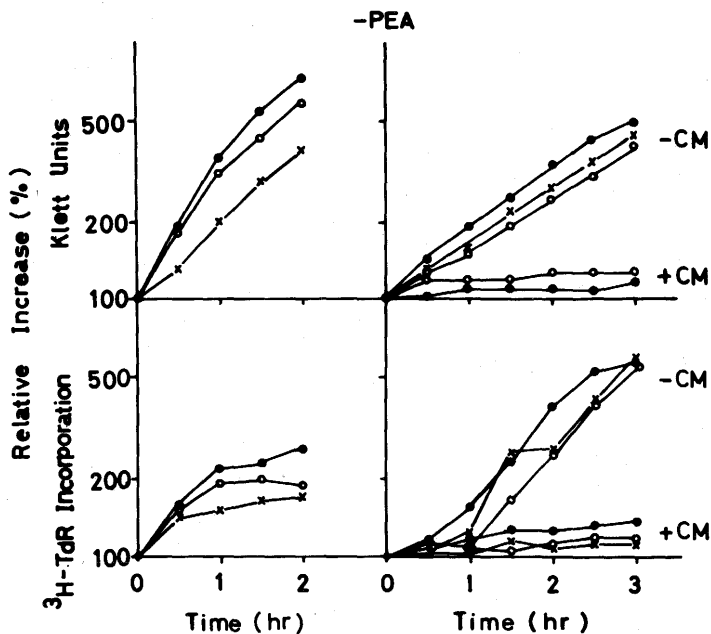


図6 PEA<sup>S</sup>-11 の PEA を除いた後の複製の再開に及ぼす CM の効果。



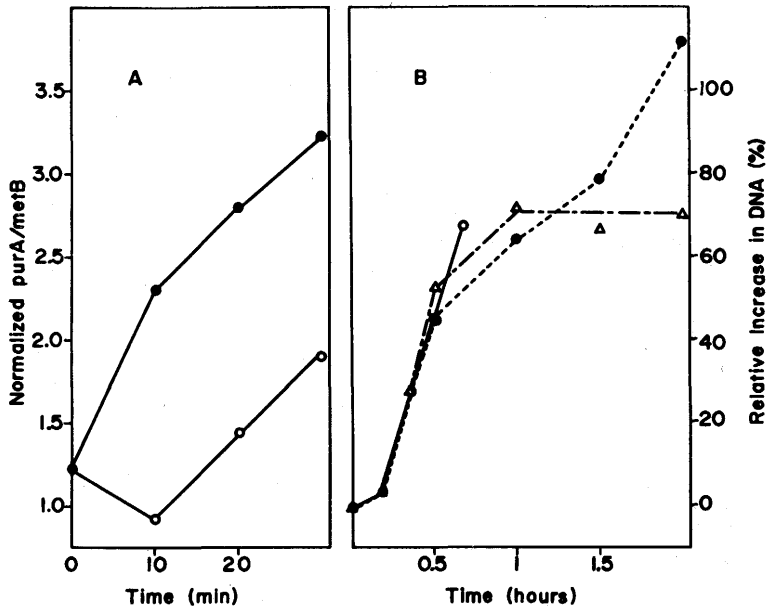
各濃度の PEA を 0 time に加えて, 2 時間培養し, 次いで PEA を除いて後, CM 有無下での菌の増殖を, PEA を添加した時または除去した時を 100 として, Klett の相対値で示した (左および右の上図)。同様に  $^3\text{H-TdR}$  の DNA への取込みの相対的増加量を下図に示した。

●—●, ○—○, ×—×: それぞれ 0.1%, 0.2%, または 0.3% PEA 存在下での値および, 除去後の値を示す。

取込みが阻害され、ts6057の高温の阻害は低温に戻しても回復しないで新たな蛋白合成を必要とする事が示された(図3)。一方 tsMH27 はCM 存在下で30°Cに戻した場合、30°Cに戻した時点の DNA 量の100%の増加が見られた。ところが Rif を加えて戻した場合は、はなはだしく  $^3\text{H-TdR}$  の取込みが阻害されわずか10-20%の増加が認められただけであった(図4)。この Rif による阻害効果が複製開始反応の阻害によるのか、複製の継続反応の阻害によるのかを調べる為、戻してから適時の細胞から DNA を抽出し、purA/metB 比を調べて見た(図4)。複製再開始後、CM 存在下で培養した細胞の purA/metB 比は、薬剤を含まない場合と同様に2に増加した。一方 Rif 存在下では、ほとんど1に留まっていた。こ

られの結果は、tsMH27 においては、30°Cに戻した後の複製の再開始に蛋白合成は必要としないが RNA 合成を必要とすることを示す。即ち、複製再開始に対する RNA の関与は、メッセンジャー-RNA 合成阻害により蛋白合成ができなくなる事により間接的に働いているのではなく、RNA 自身または RNA 合成が直接的に関与していることを示す。なお、LP 培地で対数増殖している野性株に CM 又は Rif を加えた場合、DNA は両者とも約100%増加して停止する。この時の purA/metB 比も約4から1にまで低下する。この事実は、CM 又は Rif が複製の開始は阻害するが、継続反応は阻害しないことを示す。tsMH27 において高温で阻害されるものが、複製開始に必要な RNA なのか、蛋白なのか、この実験だけで

図7 MH27の複製再開始に及ぼすチミン飢餓の影響



MH27を図1と同じ方法で48°Cで1時間培養後、membrane filter で濾過し、細胞をCgで洗い、ついで20種のアミノ酸(各々25 $\mu\text{g/ml}$ )を含む2倍量のCgに懸濁した。

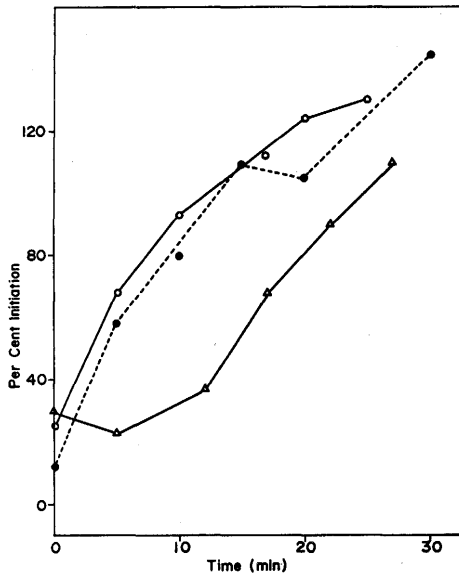
A: 上述の懸濁液を2等分し、その一方には直ちに(○—○)、他方には30°Cで30分チミン飢餓後(●—●)、TdR(5 $\mu\text{g/ml}$ )を加えて(0timeとする)30°Cで培養し、適時DNAを抽出後、purA/metB比(sporeDNAで補正)を求めた。

B: 懸濁液を30°Cで30分チミン飢餓培養後、3等分した。1)  $^3\text{H-TdR}$ を加えて30°Cで培養(○—○)、2)  $^3\text{H-TdR}$ とRif(1 $\mu\text{g/ml}$ )を加え30°Cで培養(●……●)、3)  $^3\text{H-TdR}$ を加え48°Cで培養(△—△)し、各時DNAに取りこまれた放射能活性をTdRを加えた時(0time)の値を0として増加分を%表示した。

はわからない。

さらにフェネチルアルコール感受性変異株, PEA<sup>S</sup>-11において, PEA をのぞいた後の複製開始は, CM に感受性であった(図6)。この点では, ts6057と同じであるが, ts6057は0.3%PEA に耐性であった(データは示さない)。以上の複製再開始に対する高分子合成阻害の結果をまとめると, 複製再開始反応は, ts6057および PEA<sup>S</sup>-11 ではともに CM 感受性で, tsMH27 は CM に耐性で Rif に感受性であった。なお大腸菌の複製開始変異株の dnaC の複製再開始は CM 耐性であるので, dnaC および MH27 各遺伝子産物は性質の似た蛋白で同じ機能を

図8 温度を30°Cに戻した後の複製再開始能力の蓄積。



MH27をLPで培養し, 30°Cから48°Cに移して1時間後, 新しいLPで2倍希釈し, 30°Cに移してから適時10mlずつ2つのサンプルを採取した。一方には, Rif(1μg/ml)を加えて30°Cで培養し, 30°Cに戻して60分後, 細胞からDNAを抽出し, purA/metB比を測定した(○—○)他方は再び48°Cに移し, 30°Cに移してからの時間で算定して30分後(最初の4サンプル), または40分後(後の2サンプル)の細胞からDNAを抽出し purA/metB比を求めた(●……●)。結果をpercent initiationに換算して, サンプルを取り出した時間に対してプロットした。また, 30°Cに戻して各時10mlを取り出し, DNAを抽出後, purA/metB比を測定し, per cent initiationを計算し表示した(△—△)

持っているかも知れず興味深い。

V. DNA 複製開始反応への RNA 合成の直接的関与。

上に述べたように tsMH27の複製の再開始がCMに耐性で Rifに感受性であることから, 複製開始反応にRNA合成が必要な事が示唆された。しかしMH27を低温に戻して30分間, チミン飢餓状態において後, チミジン(TdR)を加えて複製を開始すると, Rifにも高温によっても阻害されなかった(図7)。このことは, 30°Cで30分培養する間に細胞は, 蛋白合成もRNA合成も必要としないで高温でも複製の再開始ができる能力(initiation potential)を獲得したことを意味する。この initiation potentialの獲得にRNA合成が直接的に必要とされた。

そこで次に tsMH27の耐熱性と Rif耐性の2つの複製再開始能力の獲得様式について調べた。即ちMH27を低温に戻して後, 種々な時間に再び48°C

図9 tsMH27の30°Cに戻した後の耐熱性複製再開始能力の獲得様式。

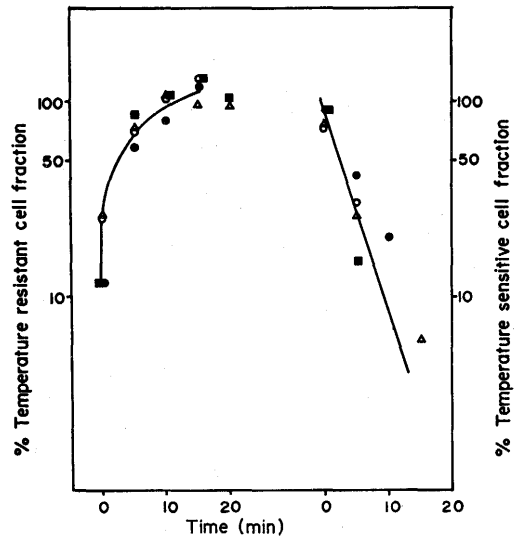


図8と同様に, 30°Cに戻してから各時48°Cに移した。そしてその時まで耐熱性の複製再開始能力を獲得した細胞の割合を, 30°Cに戻してからの時間に対してプロットした(左図)。右図は高温感受性の細胞の割合を表示した。

●, ■: purA/metB比から求めた複製開始能力

○, △: <sup>3</sup>H TdRの取込み量の増加分から求めた複製開始能力(実験方法参照)

に移すか又は Rif を加えて、その時間までに耐熱性又は Rif 耐性の複製開始能力を獲得した細胞の割り合いを調べた。その測定方法は、薬剤を加えて、DNA 合成を開始させ、purA/metB 比の最高値を調べることによって、再開始のできた細胞の割り合い (per cent initiation) を実験方法で述べた様に算出した。図 8 には耐熱性と Rif 耐性の獲得様式と、実際の複製再開始の経時変化を示す。また図 9 と図 10 は、複製開始能力を獲得した細胞の割り合いを、上述の purA/metB 比から求めた場合と実験方法で述べた様に<sup>3</sup>H-TdR の取込み量の最高値から求めた場合の数回の実験をまとめてプロットした。両図において左図は、複製再開始が Rif 耐性又は耐熱性となった細胞の割り合いが時間と共に増加している事を示し、右図は、逆に複製再開始が Rif 感受性または高温感受性の細胞の割り合いが両者共、よく一致して半減期が 2~3 分の割り合いで減少している事を示している。即ち MH27 遺伝子産物は低温に戻すと直

ちにその活性を回復し、その回復の経時変化と RNA 合成の経時変化はほぼ一致した。さらに図 8 は、Rif 耐性および耐熱性の複製開始能力が獲得された後、実際の複製開始までに 15 分間要することを明示している。この lag は 48°C で 30 分間培養後 30°C に戻した場合にはほとんど観察されずしかも Rif 感受性であった (データは示していない)。この期間は 48°C で二次的にこわれたものの再構成に必要な時間とも考えられる。この期間以前に蛋白質も RNA も機能を果たしてしまっているのか、30°C で 15 分間安定に保たれていると思われる。tsMH27 の複製再開始能力の獲得過程で MH27 遺伝子産物の作用するステップと RNA 合成のステップとが時期的によく一致していたので、RNA 合成の時期を目安にして、MH27 産物の作用する時期と、6057, PEA<sup>S</sup>-11 遺伝子産物の合成と作用する時期の順序性を次に検討した。

#### VI. 6057, PEA<sup>S</sup>-11 両遺伝子産物の合成およびその作用過程と RNA 合成の順序性

上述の tsMH27 の Rif 耐性または耐熱性の複製開始能力の獲得様式の場合と同様に、PEA<sup>S</sup>-11, ts6057 を nonpermissive から permissive な条件に戻した時の複製開始能力の獲得様式を調べた。両変異株とも複製再開始に蛋白合成を必要とすることから、両遺伝子産物は nonpermissive 条件下で、その必要な蛋白質または蛋白合成が不可逆的に失活している、複製再開始には新たな合成を必要とすることが示された。そこで両遺伝子産物の合成様式を、CM 耐性の複製再開始能力の獲得様式により、また両遺伝子の作用の時期を PEA 耐性または高温耐性の獲得様式により調べ、RNA 合成の時期と比較検討した。図 11 にその結果を示す。

PEA<sup>S</sup>-11 遺伝子産物の合成される時期は、RNA 合成の時期より約 7 分早く、PEA<sup>S</sup>-11 の作用時期は、RNA 合成の時期とほぼ一致した。一方、6057 遺伝子産物の合成される時期は、RNA 合成の約 5 分前であった。6057 の作用時期については、データが不十分でまだ判明していない。

これらの実験から、PEA<sup>S</sup>-11 と 6057 両遺伝子産物の合成と RNA 合成に時間的差が見られ、ここでも複製開始に RNA が直接的に必要なことが明示された。これらの遺伝子産物の合成後、5~7 分たって RNA 合成が追隨すること、また RNA 合成の時期と MH27 遺伝子産物の作用する時期がよく一致していたことは既に述べたが、RNA 合成の時期と、PEA<sup>S</sup>-11 変異株の複製再開始が PEA 耐性となる時期もほぼ一致していた。

図 10 tsMH27 の Rif 耐性複製再開始能力の獲得様式。

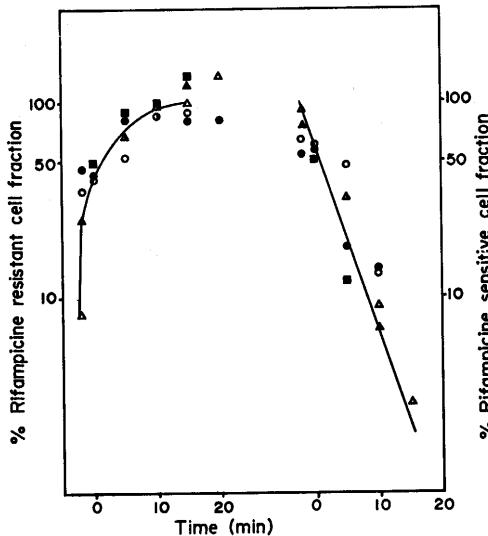


図 8 と同様に 30°C に戻してから各時 Rif を加えて培養し、Rif を加えた時まで Rif 耐性の複製再開始能力を獲得した細胞の割り合いを図 9 と同様にプロットした (左図)。右図は Rif 感受性の細胞の割り合いを表す。

- , ▲, ■ : purA/metB 比から求めた複製開始能力 (実験方法参照)
- , △ : <sup>3</sup>H-TdR の取込み量の増加分から求めた複製開始能力 (実験方法参照)

## 考 察

これまで述べてきたように、枯草菌では形質転換が容易であり、また複製起点近傍の遺伝子と複製終点近傍の遺伝子が同定されており<sup>18)</sup>、これらの遺伝子頻度の測定<sup>19)</sup>によって複製開始の変化が直接調べられる。実際にこの研究においても、複製開始変異株の同定を始め、変異株を nonpermissive な状態から permissive な状態に戻した時の複製再開の経時変化や複製開始能力の測定に、この遺伝子頻度測定法は有効に利用された。

これらの特徴を利用した本研究により、次のことを明らかにした。

## 1. 複製開始に関する因子の解明

複製開始に関する2つの高温感受性菌 (ts6057 と tsMH27) および1つの PEA 感受性菌 (PEA<sup>s</sup>-11) が単離され、前2者の変異は、遺伝子地図上、異なる部位に位置することが明らかとなった。一方 PEA<sup>s</sup>-11 についてはまだマッピングされていないが PEA 感受性においては両高温感受性菌と異なった。これら変異株の変異した遺伝子が支配する因子の物質的実体としては、ts6057 と PEA<sup>s</sup>-11 における複製再開が CM に感受性であることから、それぞれの遺伝子産物は複製開始に関する蛋白質または蛋白質合成に関

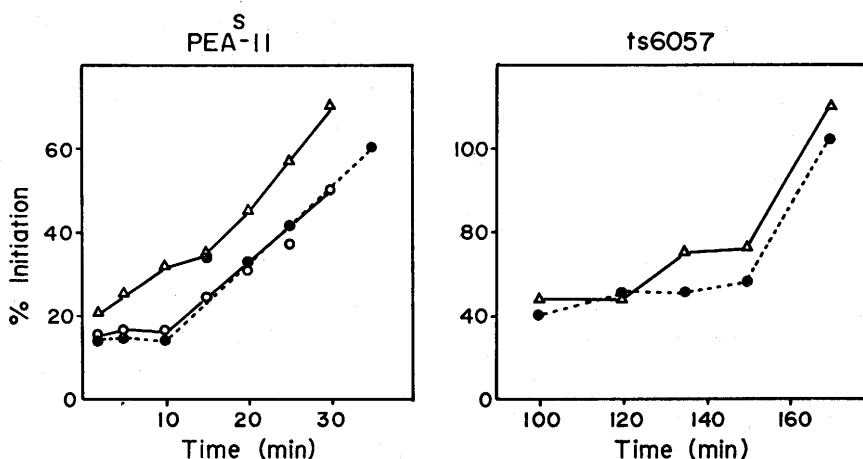
るものであることが示された。tsMH27 では同過程が CM に耐性で Rif に感受性であることから、RNA 又は RNA 合成に関与する因子がその産物である可能性が考えられる。しかし tsMH27 において、高温処理ののち低温に戻してチミン飢餓の間に作られた複製開始能力は、高温でも保持されるが、47°C で Rif を添加するとすみやかに消失したことから、この変異株は、47°C でも同能力の維持に必要な活性のある RNA 合成を行っていることが考えられる。従って、MH27 の遺伝子産物は、複製開始に必要な RNA または RNA 合成に関したのではなく、高温で可逆的に不活化する蛋白質である。

故に上記の変異した2~3種の遺伝子はいずれも複製開始に必要な蛋白質または蛋白質合成に関する遺伝子産物をコードしていることが明らかになり、開始反応に必要な RNA を含めて3~4つの因子が本反応に関与していると考えられる。そこで次にこれらの諸因子の合成と作用の時間的経過を調べることから、複製開始に含まれるステップを考察した。

## 2. 複製開始に関する諸因子の合成と作用の時間的経過の解明。

Larkら<sup>11)</sup>は大腸菌を用いて、アミノ酸飢餓の方法で複製開始を阻害し、その後アミノ酸を添加して複製を再開させ、その再開に対する CM と Rif の

図11 PEA<sup>s</sup>-11 および ts 6057 の複製再開能力の獲得様式



左図：PEA<sup>s</sup>-11のCM耐性(△—△), Rif耐性(●……●), および PEA 耐性(○—○)の複製再開能力を表わす。

右図：6057のCM耐性(△—△), Rif耐性(●……●)の複製再開能力を表わす。

図9、図10と同様に各時、各薬剤を加えて複製再開能力を<sup>3</sup>H-TdRの取込み量の増加分から求めた。(実験方法参照)

効果から、複製開始に蛋白合成と RNA 合成の必要なこと、および両者の間には5~10分の時間差のあることを明らかにした。しかし枯草菌においては、孢子発芽時の DNA 複製開始に必要な蛋白合成と RNA 合成が時期的に一致し(図12)、このことは、枯草菌においては、蛋白質と RNA が同時に合成される可能性を示唆していた。

ts6057, PEA<sup>s</sup>-11 の両変異株を nonpermissive な条件から permissive な条件に戻した後の複製再開始に必要な蛋白合成と RNA 合成の間には、5~7分の時間差が認められた(図11)。

tsMH27 では nonpermissive な条件下でも MH27 以外の蛋白質は正常に合成されている事実(図4)から、系は異なるが、ts6057 や PEA<sup>s</sup>-11 においても、同条件下で他の蛋白質は正常に合成されていることも考えられる。そこで、この仮定に立てば、これら変異株の再開始に必要な蛋白合成の時期は、各変異に特異的な蛋白合成の時期である可能性があり、そ

の結果、その特異的な蛋白合成の時期と RNA 合成の時期に5~7分の差が見い出されたとも解釈できる。MH27 遺伝子産物の合成時期については、この産物が permissive な条件に戻した時、可逆的に活性を取り戻すため(図4)複製再開始の系では測定できない。

上記のように複製開始に必要な蛋白合成と RNA 合成との間には、前者が先行し、一定の時間差があることが見い出されたが、次にこれら遺伝子産物が実際にいつ作用するのか、その時間的経過を調べた。

図8, 図9, および図10に示されているように、tsMH27 を高温から低温に戻した後、複製再開始が高温感受性の細胞、および Rif 感受性の細胞のいずれもほぼ一致して半減期が約2~3分の割合で直ちに減少した。両者の時間差が短い為、どちらが先行するかを決定するにはこの実験のような誤差範囲を含んだ測定方法では不可能と思われる。このことは少なくとも、MH27 産物の活性化の時期又は MH27 活性産物の作用の時期と RNA 合成の時期が密接に関係していることを示唆した。また 6057 や PEA<sup>s</sup>-11 の nonpermissive の状態では、MH27 産物は正常に存在すると考えられることから、6057 と PEA<sup>s</sup>-11 で見い出された蛋白合成と RNA 合成の時間差、5~7分(図11)の間で、RNA 合成を可能にする step が進行し、MH27 産物はこの step の最後か、または RNA 合成も含めたステップに関与していると考えられる。さらに PEA<sup>s</sup>-11 の再開始において RNA 合成時期と PEA に対する抵抗性を獲得する時期がほぼ一致すること(図11)は、たとえ PEA 産物が合成されても他の component との相互作用を経過しなければ PEA 耐性を獲得しえないことを示している。また PEA 産物と相互作用をする component の中に RNA も含まれる可能性もある。この PEA<sup>s</sup>-11 産物と他の component との相互作用の可能性の1つに、複合体構成のステップがあることが推測される。

この推測も含めて以上の結果から、複製開始反応に少なくとも次のようなステップが存在することを示している。

(蛋白質成分の合成)

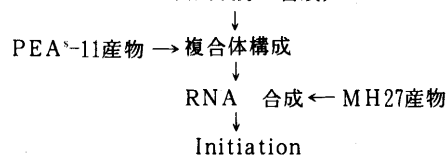
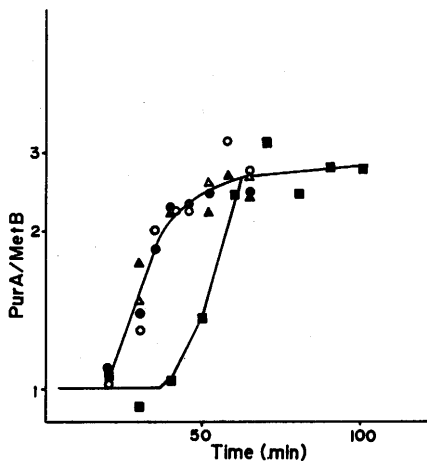


図12 168 (LTT) 孢子発芽時における CM 耐性、と Rif 耐性の複製開始能力の獲得様式と複製開始の経時変化



Cg-GM11培地で発芽させ、各時薬剤を加えて培養を続け、発芽開始後90分と105分後のpurA/metB比を薬剤を加えた時間に対してプロットした。また各時 purA/metB比を測定して、複製開始の経時変化を調べた。

+Rif: 90分(○—○), 105分(△—△)の purA/metB

+CM: 90分(●—●), 105分(▲—▲)の purA/metB. purA/metB 比の経時変化

(■—■)なお培養温度は37℃で行った。

このモデルの中で RNA 合成が複合体構成のステップに含まれる可能性もある。さらに、MH27 産物は複合体構成の最後か、RNA 合成と同時にまたは直後かはわからない。また PEA<sup>s</sup>-11 産物は複合体構成のステップに含まれる可能性が強く、PEA<sup>s</sup>-11 はこの複合体構成後または RNA 合成後 PEA 耐性を獲得すると考えられるがいづれかはわからない。複製開始反応に複合体構成のステップの存在する可能性については、Bleecken<sup>33)</sup> によって既に提案されており、彼のモデル (replisome モデル) の中で複製開始反応は、複製起点を含んだ DNA と蛋白、RNA が細胞膜に結合した complex (replisome) で行われる可能性を示している。このモデルでは RNA は complex の構成成分として複製開始に関与している。著者らの見出した複製開始に関与する RNA の役割について次に考察して見る。

### 3. RNA の役割

複製開始反応に RNA が関与していることは図 4 と図 11 で明示されたが、この RNA の役割については、2つの可能性が考えられる。第 1 の可能性は、ファージ<sup>34)</sup> や小レプリコンの系<sup>35)</sup> で報告されているように dXTP を最初に結合させるプライマーとして作用することである。tsMH27 を低温に戻すと同時にチミン飢餓培養をする間に蓄積された複製開始能力の維持に依然として RNA 合成を必要とすること、又これまで 3 つの変異株の複製開始の系で調べた限り、RNA 合成は複製開始の最後のステップと考えられること、これらの現象は、RNA の役割としてプライマーの可能性を示唆する。これまで岡崎ら<sup>36)</sup> によって、複製点に RNA がプライマーとして関与していることが示されたが、この場合の RNA 合成は Rif に耐性で複製継続中の RNA のターンオーバーの速度も速い。しかし本論文で示された RNA は Rif に感受性 (図 4、図 11) で、RNA のターンオーバーの速度は、チミン飢餓の状態で測定した場合 30°C で半減期が 80 分であった。Rif に対する感受性、およびターンオーバーの速度において、複製開始に必要な RNA と複製点における RNA は異なるようであったが、ターンオーバーの速度に関しては、複製点の RNA は複製継続中に測定した値であり、複製開始に必要な RNA の場合には、複製開始を阻害した状態で測定している為、厳密には比較できない。

第 2 の可能性は、複製開始に必要な構造体の構成成分として要求される場合である。本論文の考察の 2 で述べてきたように、複製開始反応に複合体構成のステップの存在が示唆され、このステップと RNA 合成

の時期がほぼ一致している可能性が高いことを考慮すると、Bleecken の提案した replisome<sup>33)</sup> の構成成分の 1 つとして RNA が機能していることも推測される。tsMH27 を低温に戻した時、Rif 耐性と耐熱性を獲得した後、実際の複製開始までに約 15 分の lag があったこと (図 8) と、枯草菌の孢子発芽時に CM 耐性、Rif 耐性となった後、実際の複製開始に同様に 15 分の lag が観察されたこと (図 12)、これらの知見も又 RNA の役割りとして第 2 の可能性を支持する。しかしこの lag に関しては、CM や Rif に耐性で非常に遅い未知の反応が、purA の複製に先行するという可能性によっても説明でき、これだけの実験結果だけでは決定できない。

## 要 旨

枯草菌から、DNA 複製開始に関する変異株を 3 株単離した。これら変異株のうち 2 株 (ts6057 と tsMH27) は遺伝的に異なる高温感受性株で、残りの 1 株 (PEA<sup>s</sup>-11) は  $\beta$ -フェネチルアルコール (PEA) に感受性となった変異株である。得られた 2 株の高温感受性株はいずれも、PEA 感受性株に比べて低い PEA 感受性を示した。

これらの変異株を non-permissive な状態から permissive な状態に戻した時、正常な複製起点から複製が再開始した。そこで次に、それぞれの変異株の複製再開始について解析した。その結果次の事実が明らかになった。

1. 得られた 3 種類の変異株はいずれも、複製開始に必要な蛋白質又は蛋白合成が高温感受性又は PEA 感受性となった変異株であった。

2. 複製開始に RNA (I-RNA) または RNA 合成が直接的に関与している。

3. 2 つの変異株 (ts6057 と PEA<sup>s</sup>-11) の複製再開始に必要な蛋白合成は、I-RNA 合成の 5 ~ 7 分前に起った。

4. I-RNA 合成は、tsMH27 遺伝子産物の活性化と同時にまたは直後に起った。

5. PEA 処理した PEA<sup>s</sup>-11 変異株を PEA を除いた状態で培養すると、細胞は実際に複製が再開始する前に、PEA 存在下でも複製の再開始ができる能力を獲得する。この PEA 耐性となった細胞は、PEA<sup>s</sup>-11 遺伝子産物の合成後 7 分たつて現われ、この時期は、I-RNA 合成の時期とほぼ一致した。

これらの結果は、複製開始に必要なすべての蛋白の合成後、I-RNA 合成を可能にし、PEA 感受性菌を PEA 耐性にする未知の process が起っているこ

とを示唆した。この process として Initiation complex 形成の可能性を提案する。また I-RNA の役割についてはまだわからないが、2つの可能性について考察した。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、御指導、御校閲を賜りました吉川寛教授に深く感謝致します。また研究の進め方、あるいは実験の方法に関して、適切な助言をいただいた同研究室の村上清史博士、山口和男博士に心から感謝致します。また変異株の1株を供与下さいました山口光代さん、および図表の作成に助力をいただいた寺田和代さんに謝意を表します。

### 文 献

- 1) Cooper, S. & Helmstetter, C. E. : J. Mol. Biol., 31, 519 (1968).
- 2) Helmstetter, C. E. & Cooper, S. : J. Mol. Biol., 31, 507 (1968).
- 3) Bird, R. & Lark, K. G. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 799 (1968).
- 4) Oishi, M., Yoshikawa, H. & Sueoka, N. : Nature 204, 1069 (1964).
- 5) Maaløe, O. & Hanawalt, P. C. : J. Mol. Biol., 3, 144 (1961).
- 6) Lark, K. G., Repko, T. & Hoffman, E. J. : Biochim. Biophys. Acta 76, 9 (1963).
- 7) Helmstetter, C. E., Cooper, S., Pierucci, O. & Revelas, E. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 809 (1968).
- 8) Gross, J. D. : Current Topics in Microbiol. and Immunology, 57, 39 (1972).
- 9) Wechsler, J. A. & Gross, J. D. : Mol. Gen. Genet., 113, 273 (1971).
- 10) Lark, K. G. & Renger, H. : J. Mol. Biol., 42, 221 (1969).
- 11) Lark, K. G. : J. Mol. Biol., 64, 47 (1972).
- 12) Goulian, M., & Kornberg, A. : Proc. Nat. Acad. Sci., 58, 1723 (1967).
- 13) Wickner, R. B., Wright, M., Wickner, S. & Hurwitz, J. : Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 3233 (1972).
- 14) Earhart, F., Tremblay, G. Y., Daniels, M. J. & Schaechter, M. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 707 (1968).
- 15) Sueoka, N. & Quinn, W. G. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 33, 695 (1968).
- 16) Helmstetter, C. E. : J. Mol. Biol., 84, 1 (1974).
- 17) Ryter, A., Hirota, Y. & Schwarz, U. : J. Mol. Biol., 78, 185 (1973).
- 18) Yoshikawa, H. & Sueoka, N. : Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 559 (1963).
- 19) Sueoka, N. & Yoshikawa, H. : Genetics, 52, 747 (1965).
- 20) Haas, M. & Yoshikawa, H. : J. Virol., 3, 248 (1969).
- 21) Yoshikawa, H. : Proc. Nat. Acad. Sci., 65, 206 (1970).
- 22) Yoshikawa, H. : Genetics 54, 1201 (1966).
- 23) Kennet, R. H. & Sueoka, N. : J. Mol. Biol., 60, 31 (1971).
- 24) Miura, K. : Methods in Enzymology, eds. Grossman, L. & Moldave, K., Vol. XIA, P. 543, New York, Academic Press, 1967.
- 25) Takahashi, I. : Methods in Enzymology, eds. Grossman, L. & Moldave, K., Vol. XIIB, P. 99, New York, Academic Press, 1968.
- 26) Yoshikawa, H. : Proc. Nat. Acad. Sci., 58, 312 (1967).
- 27) Lark, K. G. & Lark, C. : J. Mol. Biol., 20, 919 (1966).
- 28) Hara, H. & Yoshikawa, H. : Nature New Biol. 244, 200 (1973).
- 29) Yoshikawa, H., O' Sullivan, A. & Sueoka, N. : Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 973 (1964).
- 30) Oishi, M., Yoshikawa, H. & Sueoka, N. : Nature, 204, 1069 (1964).
- 31) O' Sullivan, A. & Sueoka, N. : J. Mol. Biol. 27, 349 (1967).
- 32) Karamata, D. & Gross, J. D. : Mol. Gen. Genet. 108, 277 (1970).
- 33) Bleecken, S. : J. Theor. Biol., 32, 81 (1971).
- 34) Brutlag, D., Schekman, R. & Kornberg, A. : Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 2826 (1971).
- 35) Blair, D. G., Sherratt, D. F., Clewell, D. B. & Helinski, D. R. : Proc. Nat. Acad.



Sci., 69, 2518 (1972).

36) Sugino, A., Hirose, S. & Okazaki, R. :

Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 1863 (1972).

#### Abstract

Three mutants of *Bacillus subtilis*, defective in initiation of DNA replication were isolated. Two were thermosensitive and one was sensitive to  $\beta$ -phenethylalcohol (PEA). The two ts mutants were genetically different from each other and both were less sensitive to PEA than PEA<sup>s</sup> mutant.

When these mutants were incubated in non-permissive conditions to allow completion of on-going replication cycle and then shifted back to permissive ones initiation of a new round of replication occurred from the normal genetic origin. Analysis of the reinitiation by the mutant cells revealed the following facts : 1). In all cases proteins or protein synthesis was either thermosensitive or sensitive to PEA. 2). RNA (I-RNA) or RNA synthesis participated directly in initiation. 3). Protein synthesis pre-requisite to the reinitiation by the two mutants (ts6057 & PEA<sup>s</sup>) occurred 5-7 min. before I-RNA synthesis began. 4). I-RNA synthesis occurred immediately after or simultaneously with renaturation of the active product of one of the mutants (tsMH27). 5). When PEA treated mutant cells were incubated in the absence of PEA, cells acquired capacities to reinitiate replication in the presence of PEA before actual reinitiation began. This PEA resistant cells appeared 7 min. after the synthesis of PEA sensitive protein and approximately at the same time as I-RNA synthesis occurred.

These results indicate that after the synthesis of all the protein components necessary for initiation, some as yet unknown process take place leading to I-RNA synthesis and making cells resistant to PEA. We propose formation of an active initiation complex as a possible candidate for this process.

The role of I-RNA is obscure at the moment, yet two alternative roles will be discussed.

---