

綜 説

原核細胞における DNA 複製機構

寺 脇 良 郎

信州大学医学部細菌学教室

MECHANISM OF DNA REPLICATION IN PROKARYOTES

Yoshiro TERAWAKI

Department of Bacteriology, Faculty of Medicine
Shinshu University

Key words: DNA 複製 (DNA replication)
複製開始 (initiation of replication)
大腸菌 (*escherichia coli*)
プラスミッド (plasmid)
Rts1 (Rts1)

生物の定義として, Luria¹⁾ は, (1) 遺伝情報を持ち, (2) 進化することができ, (3) 細胞から成っている, の三条件をあげている。原核細胞生物の代表である細菌において, この三条件が満されていることを, 我々は試験管内の実験においてすべて見る事ができる。

DNA の複製とは, とりも直さず第1の条件である遺伝情報が, どのようにして子孫の細胞に伝えられるかという問題を取り扱う。DNA 複製機構は, 大腸菌, 枯草菌およびいくつかのバクテリオファージ, ウィルスを中心にして研究され, 現在ではそこで得られた成果を基礎に, 高等生物細胞でもこの方向の研究は発展しつつある。しかし原核細胞においても, 複製の開始機構, およびその調節機構については, 未解決の問題が山積している。

本稿では, ほとんど解明された複製の進行については簡単に触れ, 主題を開始機構にしぼりたい。なお, 記述が煩雑になることを避けるため, 原則として大腸菌についての成果に限ることとし, 最後にプラスミッドを用いて研究することの利点と, その知見の一部と, 私の最近の研究結果を紹介する。

I. DNA 複製のモデル

開始機構を含む DNA 複製の基本的モデルとして,

現在も無視することができないのが, 1963年に提唱された Jacob ら²⁾ のレプリコン仮説である。“レプリコン (複製能を持つ DNA 分子) は, (1) それぞれのレプリコンに特異的な複製の場所を細胞質膜上に持ち, (2) 自らの DNA 上に複製に関与する遺伝子を少くとも二つ——(a) 複製開始のイニシエーター蛋白をコードする遺伝子と, (b) これを受取って複製が開始されるレプリケーター遺伝子。——を持つ。”と仮定する。そして, イニシエーターも, それぞれのレプリコンに特異的であるとしている。

これら二つの特異性によって, 異なったレプリコン (たとえば宿主菌染色体とプラスミッド) が同一細胞内にあっても, それぞれ独立して複製することが可能となるし, また, 複製途中のレプリコンの間に細胞質膜が新生され, この部で細胞分裂が起ると仮定することにより, 各レプリコンが娘細胞へ均等に分配されることもうまく説明できる。

II. DNA 複製と細胞分裂

DNA 複製と細胞分裂は共通の制御機構の下になければならない。もしそうでなければ, 細胞分裂時にレプリコンを持たない娘細胞が出現することになる。レプリコン仮説ではこの点について, 上述したようにレプリコンと細胞質膜との特異的親和性を仮定した。

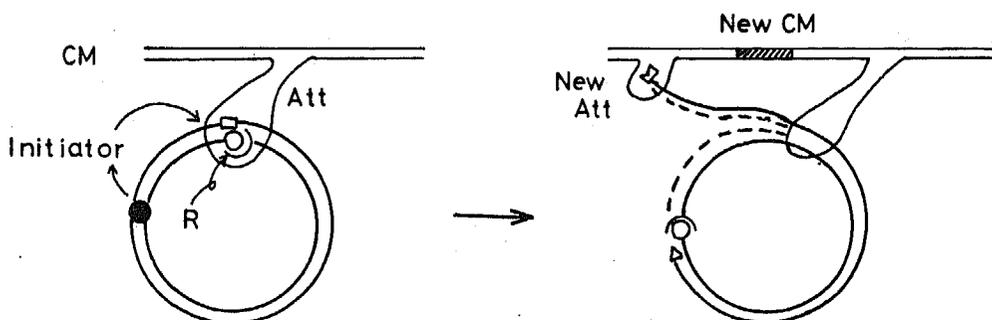


図 1 Jacob らのレプリコン仮説²⁾

レプリコンは、レプリケーター部分 (R) で細胞質膜 (CM) の特定部位 (Att) に付いている。複製開始蛋白 (initiator) が産生され、R に作用すると、2 本鎖 DNA のうちの 1 本が膜上の New Att 部分に付き、複製が始る。点線は合成途中の娘鎖 DNA。Att と New Att の中間に新しい CM が合成され、DNA 複製終了後、この部分で細胞分裂が起る。

(Jawetz, E. et al. Review of Medical Microbiology, p. 39, Lange Med. Lib. 1974 より改変)

それでは、DNA 複製と細胞分裂とは実際どのような相互関係にあるだろうか。大腸菌 (*E. coli* B/r) を使った実験により、細胞が分裂するためには、その前に染色体 DNA の複製が終了していなければならないことが証明された³⁾。この逆は真ではない。つまり、染色体の複製が始るためには、細胞分裂が終了している必要はない。なぜなら、大腸菌を栄養豊富な条件下で培養すると、細胞分裂が始る前に、同一染色体において次から次へと DNA の複製が開始されるからである。

染色体の複製は一度始ってしまうと、培養条件に関係なく DNA 鎖の伸長は一定速度で進行し³⁾、途中で蛋白合成を止めても終点までは進む。しかし、蛋白合成がない限り、染色体複製の新しいサイクルは入れない⁴⁾。

以上の事実は、細胞分裂は結局、染色体複製の開始機構に依存していることを示している。

Ⅲ. 複製進行の機構

環状をなす大腸菌染色体の複製は一定点から始まり⁵⁾、二方向へと進み、開始点のほぼ 180° 反対の位置で両進行点が合流することにより、複製は完了する⁶⁾。開始から終了までの所要時間は約 40 分と言われている³⁾。

複製開始後、DNA 鎖が伸長するとき、鋳型となる親 DNA 鎖に対応する娘鎖は連続的に作られるのではなく、短い断片が次から次へと合成され、やがて連結される (不連続複製)。この事実は、故岡崎令治教授に

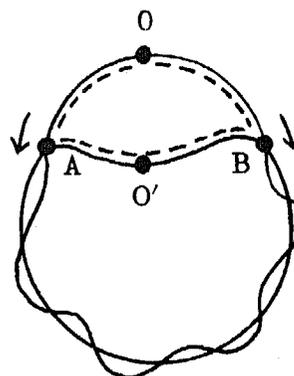


図 2 大腸菌染色体の複製 (全体像)

複製開始点 (O, O') で 2 本鎖 DNA がほぐれ、二方向に複製は進行する。A, B は複製の進行点。

より決定的に証明された⁷⁾⁸⁾。

そのしくみは次のような一連の反応により起る。

- (1) 2 本の親 DNA 鎖が進行点でほぐれるに従い、親鎖の随所で短い RNA 鎖 (RNA プライマー) が合成される。
- (2) RNA プライマーに連続して約 10S の長さ——約 10^6 ダルトン——の DNA 断片が合成される。
- (3) RNA プライマーが切除され、隣り合った DNA 断片が連結される。以上の各ステップに関与する酵素は次のものである。(1) *dnaG* 遺伝子産物である RNA ポリメラーゼによる RNA プライマーの合成⁹⁾。(2) DNA ポリメラーゼ III による DNA 断片の合成開始と、DNA ポリメラーゼ I による合成完了。

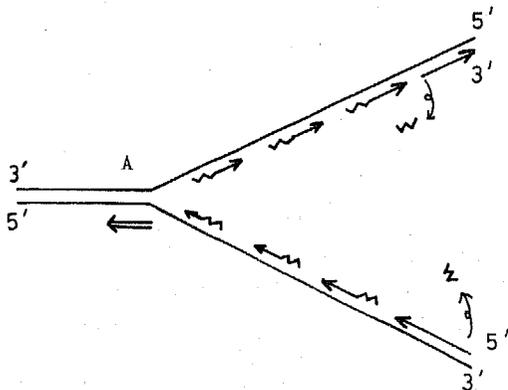


図 3 DNA 鎖の伸長(図2, A部分の拡大像)

Okazaki fragment の合成と連結が次々に起こる。w は RNA プライマーを表わす。

(3) DNA ポリメラーゼ I による RNA プライマーの切除と, DNA リガーゼによる DNA 断片の結合。岡崎教授の業績に因んで, この DNA 断片は Okazaki fragment と名付けられた。現在残された問題点は, RNA プライマーが合成される部分に対応する親 DNA 鎖に, 特別な塩基配列があるかということである。

このような DNA 鎖伸長の際の不連続複製は, 大腸菌に限られたことではなく, T4 フェージ¹⁰⁾や, 発癌ウィルスである SV40¹¹⁾でも証明されている。

IV. 複製開始機構

A. 複製開始と蛋白合成

レプリコン仮説ではイニシエーター蛋白の存在を想定しているが, 大腸菌染色体の複製開始に蛋白合成が必要なことは早くから判っていた。クロラムフェニコール (Cp) を加えることにより, または菌をアミノ酸飢餓の状態におくことにより蛋白合成を停止させると, 染色体 DNA は複製の新しいサイクルに入れない⁴⁾。このことは, 複製開始の度毎に蛋白合成がなければならない, 言い換えると, 開始に必要な蛋白は常に十分量存在するのではなく, DNA 複製のサイクル毎に新たに合成されなければならないか, または一定濃度まで蓄積されなければならないことを意味する。その後, 複製開始に必要な蛋白は 1 種類ではないことが判って来た。E. coli 15T⁻ を使い, 分裂時間の長い培養条件下において, 加える Cp の濃度と, 添加の時期をいろいろ変えて複製開始に与える影響を調べた

ところ, 開始30分前までは低濃度の Cp により開始が抑えられるが, それ以後はこの濃度では抑えられず, 高濃度の Cp を必要とすること, そしてこの濃度でも開始15分前以降に加えたのではもはや開始抑制効果はないとの成績が出された¹²⁾。このことは, 開始に必要な蛋白は少なくとも 2 種類あること, 複製開始直前にはこれらの蛋白はすでに合成されていることを示している。

一方, 遺伝学的解析によっても, 蛋白因子群の必要性は確認された。1970年前後より, 高温で複製不能の変異株が多数分離, 解析されるようになって来たが, これらは複製開始が温度感受性のものと, DNA 鎖の伸長が温度感受性のものとに大別される。DNA 複製に関係する遺伝子は一般に *dna* の記号で表現されるが, 開始に関与する遺伝子として確認されているのは, *dnaA*¹³⁾, *dnaC*¹⁴⁾, *dnaH*, *dnaP*¹⁶⁾ などである。これらの遺伝子は, 当然それぞれ蛋白をコードしているはずであるが, 現在単離されているのは *dnaC* 遺伝子産物¹⁷⁾ (分子量25,000) だけである。従って, これら 4 つの遺伝子産物の生化学的役割も, 最終的に決定されるには程遠い状態にある。

判っていることは, (1) *dnaA* 変異株では複製開始に必要な RNA プライマー(?) が合成されない¹⁸⁾。(2) *dnaC* 変異株では RNA は合成されるが, それが DNA に付くことができならしい。(3) *dnaP* 変異株では細胞質膜に変化が起きている¹⁶⁾。などである。

B. 複製開始と RNA 合成

複製開始の段階で RNA 合成を必要とすることは確実である。このことは, RNA ポリメラーゼの阻害剤であるリファンピンを複製開始の直前——先に述べた高濃度の Cp を加えても, もはや開始を抑えられない時期——に添加すると複製が始らない事実により証明された¹⁹⁾。DNA 鎖伸長のとき, Okazaki fragment の合成に先行する RNA プライマーの合成は, リファンピンに非感受性であるので, 複製開始時に必要な RNA 合成とは明らかに異なる。大腸菌無細胞系の実験でも, DNA 合成の鋳型として提供された 1 本鎖は, まず RNA ポリメラーゼによる転写, すなわち RNA 鎖の合成が先行したとき初めて有効に鋳型としての機能を果たすことも判っている²⁰⁾。

RNA 合成の役割は, 複製開始の最初の段階でまず短い RNA 鎖が合成され, これに引続いて DNA 鎖が付加され, 伸長して行く, つまりプライマーとして

働くのか、または、リボゾームにおけるリボゾーム RNA の如く、この RNA を核として種々の複製開始蛋白が集合し、開始複合体を形成するのか、いくつかのモデルが考えられているが、まだ確実なことは判っていない。

大腸菌のほか、ファージ M13, ϕ X174²¹⁾22)でも、また F 因子²³⁾、ブドウ球菌の R プラスミッド²⁴⁾でも、DNA 複製に RNA 合成が必須の因子として関与していることが報告されている。

C. 複製開始と細胞質膜

レプリコン仮説では、各レプリコンが細胞質膜上のそれぞれの指定席に付いていることを第 1 の条件にしている。事実、複製の開始点と進行点とが、膜面分と結合した状態で分離されたとの報告は極めて多く²⁵⁾25) (他省略)、DNA 複製に細胞質膜が関与していることは間違いない。

大腸菌の他、枯草菌でも同様の事実は知られており²⁷⁾、また染色体以外のレプリコンとして、ファージ ϕ X174, fd の複製型 DNA が細胞質膜に付いて、次々に子孫のファージ DNA を作っていること²⁸⁾29)、 λ ファージがすでに宿主染色体に組み込まれている状態の菌に、さらに λ ファージを重感染させると、このファージ DNA は膜に付くことができず、複製できないで終る³⁰⁾ことなどが知られている。しかし、具体的にどのような機構によって細胞質膜が DNA の複製開始と進行に役立っているのか、まだ解明されていない。

極めて単純に考えると、“絡み合った 2 本鎖 DNA の 1 か所 (開始点) に、開始蛋白の酵素作用により切れ目が入り、unwinding protein³¹⁾の分子が次々に両方の DNA 鎖に付くことによってはぐれて行く”ためには、もう一つの条件として物理的な支点が必要であろうことは想像に難くない。このような支点として、細胞質を囲んでいる膜は最も考え易い構造物であるが、単にそれだけではないであろう。

最近、細胞表層 (outer membrane) に存在する蛋白が、染色体の複製開始と密接に関連していることを示す美事な実験成績が報告された³²⁾。すなわち、*E. coli* B/r の染色体複製の開始前に、outer membrane に於いて、分子量約 80,000 の蛋白が一過性にかつ爆発的に増加すること、*in vitro* の実験でこの蛋白が DNA に結合することが確認された。しかしこの蛋白は、複製開始に大きな役割を果していると考えられる *dnaA* 遺伝子産物とは、その作用する時期にズレがあることから、異なった蛋白と考えられる。今のところ、

この蛋白の機能としては、染色体を膜上の“指定席”に結合させる働きをしているのではないかと推定されている。今後、もしもこの物質が、大腸菌染色体の複製開始部と特に強く結合することが証明されたら、非常に興味深い。

V. 複製の調節機構

複製開始に至る事象を単純に模式化すると次のようになる。(1) 複製開始点が細胞質膜の特定部位に付き、(2) 開始に必要ないくつかの蛋白が合成され、(3) RNA ポリメラーゼにより RNA プライマー(?) が合成される。そして初めて DNA 複製が開始される。それでは、このような一連のでき事の引金は何によって、いつ引かれるのであろうか。これがすなわち調節機構であるが、今のところ何も判っていないと言っただけで過言ではない。

現在、大別してポジティブコントロール説と、ネガティブコントロール説とがある。

ポジティブコントロール説の原型は、上述のレプリコン仮説である。つまり、複製開始点は常に switch on の状態にあり、イニシエーターが作用しさえすれば複製に go のサインが出る。従って、イニシエーターの合成自体が調節機構になっていると言えよう。一つの考え方は、イニシエーターは常に産生されており、一定濃度に達したとき、開始点に働くとする。“濃度”で規定されるから、産生量と細胞の大きさの相互関係により、複製開始が調節されることになる³³⁾。

一方、ネガティブコントロール説では、イニシエーターに対するインヒビターが存在するために、開始点は switch off の状態にある。しかし、インヒビターは複製開始直後に一過性に合成されるため、細胞の発育に伴いその濃度が低下し、閾値以下になると off から on に切り換わり、イニシエーターが働いて複製が始る³⁴⁾と考える。

そもそも、ネガティブ説が提唱された所以は、“F 因子が染色体に組み込まれた状態の菌 (Hfr 菌) では、も一つの F がプラスミッドとして存在し得ない”現象を、レプリコン仮説ではうまく説明できなかったことに由来する。しかし、両方の説とも、イニシエーターとインヒビターの違いはあれ、ある critical な濃度を複製開始の条件として設定している。実際にそのような微妙な濃度があり得るのかという疑問が持たれる。

この他、複製開始点が付着している細胞質膜部分の伸長が、開始のシグナルになるとの説も提唱されている³⁵⁾³⁶⁾。

どのモデルが正しいかは、物質としてイニシエーターなり、インヒビターなりが分離されるまでは決着はつかないであろう。現在はまだ混とんとした状態にあり、従って、こゝにプラスミッドを研究材料として切り込んで行く余地があるわけである。

Ⅶ. プラスミッドを用いての研究

“プラスミッドとは、細菌の染色体から独立して存在する遺伝単位で、それ自身複製できる DNA 分子である。” 大きさは染色体のおよそ $1/100$ ないしそれ以下であるが、独自の複製機構を持つ立派なレプリコンである。宿主細菌の細胞質中に存在し、その数(コピー数)は染色体当り 1~2 コのものから、10 コ以上のものまで、種類により様々である。しかしコピー数の多少に関係なく、宿主菌染色体の複製に平行してプラスミッドも複製し、その結果コピー数が増加する。そして宿主菌の分裂に際して、染色体と共に均等に娘細胞へ分配され、染色体当りのコピー数は一定のレベルに保たれる。

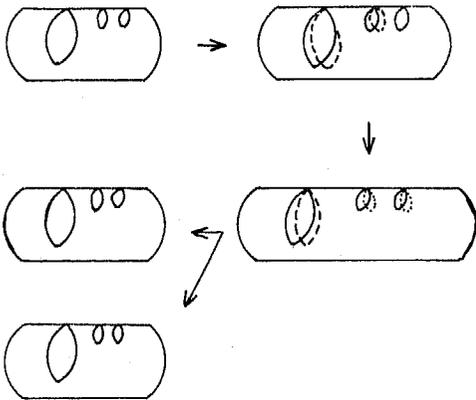


図 4 宿主菌染色体とプラスミッドの複製

大きな環は染色体、小さな環はプラスミッドを表す。染色体複製が終了したとき、プラスミッドのコピー数も 2 倍となり、宿主菌の分裂時、娘細胞へ各レプリコンは均等に分配される。簡単にするため、2 本鎖 DNA を 1 本の実線で示した。

以上のことは、プラスミッド DNA の複製もまた調節されていることを示すもので、プラスミッドが自ら

の複製を調節しているか、または宿主菌からの調節を認識する部分を、その DNA 上に持っていることになる。

A. プラスミッド結合蛋白

プラスミッドは小さな環状分子であるから、その DNA を丸ごと、そっくり分離できるのに対し、染色体 DNA は巨大なために、分離操作中に細分化されてしまう。従って、染色体 DNA の物理化学的解析には困難が付きまとう。このようなプラスミッドの持つ利点は、*in vivo* でプラスミッドに結合している蛋白を、DNA ごと傷つけることなく一緒に分離できることにも通じる。

この方向の研究の代表として、コリシン産生プラスミッド (ColE1) がある。ColE1 DNA の 2 本鎖のうち、特定の 1 本鎖に蛋白が結合していること、この蛋白にはエンドヌクレアーゼ様活性があることが報告された³⁷⁾。また、ブドウ球菌の R プラスミッドにも³⁸⁾、SV40 にも³⁹⁾、DNA 結合蛋白がある。さらに、Clo プラスミッドは、バクテリオシンの一種であるクロアシンを産生するが、この蛋白は自らの DNA に対しては特定の部位に結合し、そこに切れ目を入れる役目をする事が判った⁴⁰⁾。おそらくこの部分が複製開始点であろう。

これらの事実は、複製開始に当たって開始点に切れ目が入ることにより、からまり合った 2 本鎖がほどけ始める、との仮定が、まず間違いのないことを示している。

B. 複製遺伝子の閉じ込め

プラスミッド研究の一つの傾向として、最近脚光を浴びているのは、プラスミッド DNA を分離し、EcoRI などの制限酵素(エンドヌクレアーゼの 1 種)で切断することにより、できるだけ複製に関与する遺伝子群のみから成る断片にすることである。しかしこれのみではプラスミッドとしての存在の確認が難しいので、この断片に薬剤耐性をコードする小さな DNA 断片を結合させる。こうして出来上がったミニプラスミッドを再び大腸菌に戻し、*in vivo* でどのような複製様式をとるかを追跡する。それと言うのも、通常プラスミッドは小なりとは言え、複製遺伝子群以外に多くの DNA 部分を持っているからである。たとえば、薬剤耐性プラスミッド(R プラスミッド)には、薬剤耐性をコードする遺伝子群と、プラスミッドの接合伝達性をコードする遺伝子群があり、性因子(F プラスミッド)にも伝達遺伝子群があり、これらがプラスミッド

分子の大半を占めている。従って複製機構を調べるためには、このような“ぜい肉”を落して、複製に関与する DNA 部分だけにする、言い換えると、複製遺伝子群を極めて小さな DNA 断片に閉じ込めようというわけである。

その1例として、mini F'-km⁴¹⁾がある。このミニプラスミッドは、プラスミッド F'lac (MW 95×10⁶)の複製に必要な部分 (MW 6×10⁶)と、Rプラスミッド由来のカナマイシン耐性遺伝子部分 (MW 4.5×10⁶)を結合させたものである。mini F'-km のコピー数は、親の F'lac のコピー数と同じであることが確認された (従って、染色体当りのプラスミッド DNA の総量は、mini F'-km の方が遙かに少ない)。このことは、複製様式には両者の間に差がない、つまり mini F'-km は複製に必要な遺伝子群をすべて親と同様に持っていることを意味する。分子量から推定して、この drive unit 部分には多くとも10程度程度の遺伝子しかないはずであるから、今後生化学的な面からの解析が期待される。私見であるが、もしこの mini F'-km から、複製変異株 (たとえば、親プラスミッドよりもコピーが増加する) が得られたら、複製の調節機構を解明する上で、さらに強力な材料となるであろう。

C. Rts1 プラスミッドの複製機構

プラスミッド Rts1 は、カナマイシン耐性を持ち、高温で複製不能となるが⁴²⁾、30°C では全く安定であり、厳密な複製調節機構が働いている。このことは、(1) どのような培養条件下でも Rts1 DNA 量は宿主染色体の7%前後に保たれ⁴²⁾、(2) 宿主染色体の複製が停止すると Rts1 の複製も停止する⁴³⁾、ことから結論された。最近、我々は Rts1 を一度大腸菌染色体に組み入れたのち、も一度プラスミッドとして取り出すことにより、Rts1 の複製変異株 pTW2 を得たが⁴⁴⁾、pTW2 は複製に関し、次のような際立った特徴を示す⁴⁵⁾、(1) pTW2 DNA 量は Rts1 の5倍以上に増加している。(2) 宿主染色体の複製が停止しても、pTW2 の複製は継続する。以上の事実は、pTW2 では複製の調節が狂っていることを示している。我々は一つの可能性として、大腸菌染色体に組み込まれた Rts1 がプラスミッドとして切り出される時、Rts1 の複製調節に関与する遺伝子が置き去りにされて出て来たものが pTW2 ではないかと考えている。

現在、Rts1+ 細胞と pTW2+ 細胞の膜蛋白を比較解析中であり、Rts1 に特異的な蛋白が少なくとも2種

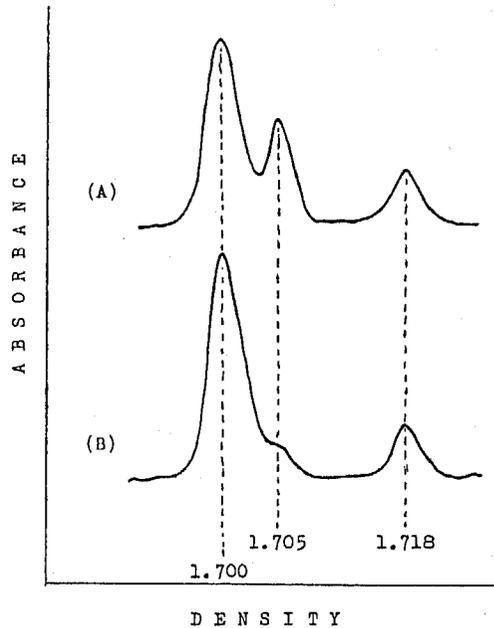


図5 Rts1 とその変異プラスミッド pTW2 の DNA 像⁴⁴⁾

Proteus mirabilis Pm17を宿主菌としたときの、両プラスミッド DNA 量の比較。密度 1.705 g/ml のピークが pTW2 DNA (A) と、Rts1 DNA (B)。1.700 は染色体 DNA、1.718 は reference DNA。

類、細胞質膜部分に存在することを確認している (未発表データ)。この蛋白が複製とどのような関係にあるかを、遺伝学的解析と相俟って決定することが目下の夢である。

おわりに

ヒトの細胞は、体積にして大腸菌の約1,000倍、細胞当りの DNA 量もほぼ1,000倍ある。23対、46コあるヒト染色体のうちの最小のもので、大腸菌染色体の10倍以上に達する⁴⁶⁾。単に大きさだけでもこれだけの違いがある。従って、大腸菌をはじめとする原核細胞における DNA 複製機構を、そのまま高等生物細胞に適用して考えることは論外であり、一つの単純なモデルとして考えることにも十分慎重でなければならない。

しかし、原核細胞においてすら、DNA 複製の開始機構、調節機構は、未知の問題に満ちた、興味深い研究分野であることを記した次第である。

DNA 複製

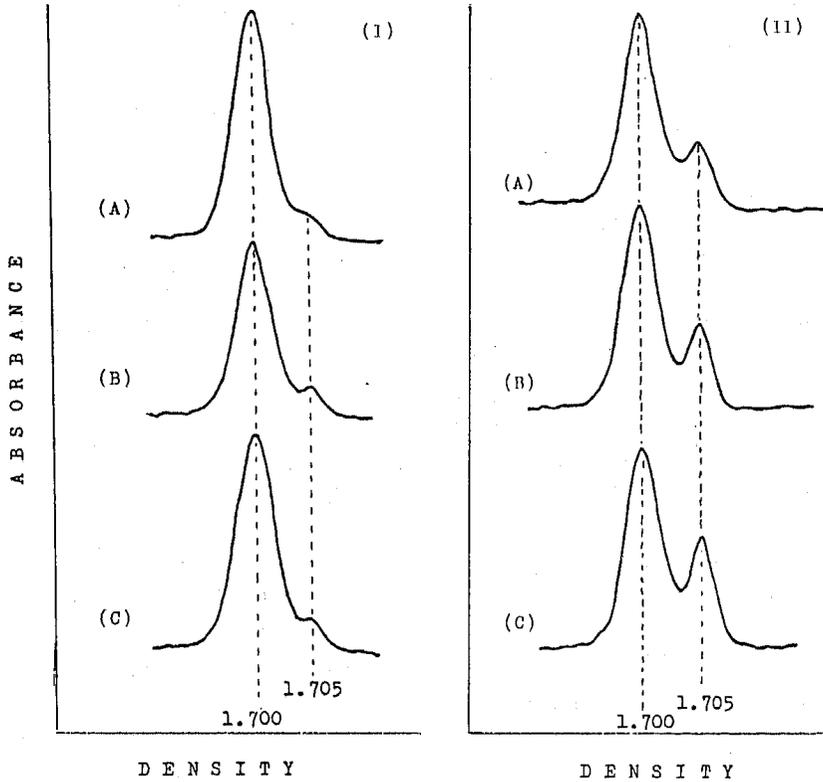


図6 RtsI DNA と pTW2 DNA の複製様式の比較⁴⁵⁾

宿主菌の染色体複製を、クロラムフェニコール (Cp) を添加することにより停止させたときの、プラスミッド DNA 量の変化を調べたもの。(I) は Pm17 (RtsI), (II) は Pm17 (pTW2), 上から Cp 添加後, 0分 (A), 120分 (B), 300分 (C) の像。(II) で, pTW2 DNA のピークが次第に大きくなっている。

なお, 最近プラスミッドについて秀れた解説書⁴⁷⁾が出版された。著者の松原謙一博士 (大阪大学教授) は, λ dv について多くの業績を挙げた研究者である。この方面の研究に興味をお持ちの方々に一読をおすすめしたい。

文 献

- 1) Luria, S. E. : Lectures in Biology p.3-6 The MIT Press, Cambridge, 1975
- 2) Jacob, F., Brenner, S. and Cuzin, F. : On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 28 : 329-348, 1963
- 3) Helmstetter, C. E., Cooper, S., Pierucci, O. and Revelas, E. : On the bacterial life se-

quence. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 33 : 809-822, 1968

- 4) Maaløe, O. and Hanawalt, P. C. : Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle. J. molec. Biol. 3 : 144-155, 1961
- 5) Bird, R. E., Louarn, J., Martuscelli, J. and Caro, L. : Origin and sequence of chromosome replication in *E. coli*. J. molec. Biol. 70 : 54-566, 1972
- 6) Bachman, B. J., Low, K. B. and Taylor, A. L. : Recalibrated linkage map of *E. coli* K-12. Bact. Rev. 40 : 116-167, 1976
- 7) Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Kaimura, R., Sugino, A. and Iwatsuki, N. : *In vitro* mechanism of DNA chain

- growth. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 33 : 129-143, 1968
- 8) Sugino, A., Hirose, S. and Okazaki, R. : RNA linked nascent DNA fragments in *E. coli*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69 : 1863-1867, 1972
- 9) Louarn, J. M. : Size distribution and molecular polarity of nascent DNA in a temperature sensitive *dnaG* mutant of *E. coli*. Molec. gen. Genet. 133 : 193-200, 1974
- 10) Sugimoto, K., Okazaki, T., Imae, Y. and Okazaki, R. : Mechanism of DNA chain growth. III. Equal annealing of T4 nascent short DNA chains with the separated complementary strands of the phage DNA. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 63 : 1343-1350, 1969
- 11) Thoren, M. M., Sebling, E. D. and Salzman, N. P. : Specific initiation site for simian virus 40 DNA replication. J. Virol. 10 : 462-468, 1972
- 12) Lark, K. G. and Renger, H. : Initiation of DNA replication in *E. coli* 15T⁻ : chronological dissection of three physiological processes required for initiation. J. molec. Biol. 42 : 221-235, 1969
- 13) Hirota, Y., Mordoh, J. and Jacob, F. : On the process of cellular division in *E. coli*. III. Thermosensitive mutants of *E. coli* altered in the process of DNA initiation. J. molec. Biol. 53 : 369-387, 1970
- 14) Carl, P. L. : *Escherichia coli* mutants with temperature sensitive synthesis of DNA. Molec. gen. Genet. 109 : 107-122, 1970
- 15) Sakai, H., Hashimoto, S. and Komano, T. : Replication of DNA in *E. coli* C mutants temperature sensitive in the initiation of chromosome replication. J. Bact. 119 : 811-920, 1974
- 16) Wada, C. and Yura, T. : Phenetyl alcohol resistance in *E. coli*. III. A temperature sensitive mutantation (*dnaP*) affecting DNA replication. Genetics, 77 : 199-220, 1974
- 17) Wickner, S., Berkower, I., Wright, M. and Jurwitz, J. : Studies on *in vitro* DNA synthesis : Purification of *dnaC* gene product containing *dnaD* activity from *E. coli*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 70 : 2369-2373, 1973
- 18) Blau, S. and Mordoh, J. : A new element in the control of DNA initiation in *E. coli*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69 : 2895-2898, 1972
- 19) Lark, K. G. : Evidence for the direct involvement of RNA in the initiation of DNA replication in *E. coli* 15T⁻. J. molec. Biol. 64 : 47-60, 1972
- 20) Karkas, J. D., Stavrianopoulos, J. G. and Cahrgaff, E. : Action of DNA polymerase I of *E. coli* with DNA-RNA hybrids as templates. Proc. nat. Acad. Sci. (wash.) 69 : 398-402, 1969
- 21) Wickner, W., Brutlag, D., Schekman R. and Kornberg, A. : RNA synthesis initiates *in vitro* conversion of M13 DNA to its replicative form. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69 : 965-969, 1969
- 22) Brutlag, D., Schekman, R. and Kornberg, A. : A possible role for RNA polymerase in the initiation of M13 DAN synthesis. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 68 : 2826-2829, 1971
- 23) Bazzicalupo, P. and Tochini-Valentini, G. P. : Curing of an *E. coli* episome by rifampicin. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69 : 298-300, 1972
- 24) Jhonston, J. H. and Richmond, M. H. : The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staphylococcus aureus* in the presence of rifampicin. J. gen. Microbiol. 60 : 137-139, 1970
- 25) Smith, D. W. and Hanawalt, P. C. : Properties of the growing point region in the bacterial chromosome. Biochim. biophys. Acta, 149 : 519-531, 1967
- 26) Parker, D. L. and Glaser, D. A. : Chromosomal sites of membrane attachment in *E. coli*. J. molec. Biol. 87 : 153-168, 1974
- 27) Sueoka, N. and Quinn, W. G. : Membrane attachment of the chromosome replication origin in *Bacillus subtilis*. Cold Spr. Harb.

- Symp. quant. Biol. 33 : 695-705, 1968
- 38) Sinsheimer, R. L. : Progress in nucleic acid research and molecular biology 8 : 115-169, ed. Davidson, J. N. and Cohn, W. E. Academic Press, New York, 1968
- 29) Hohn, B., Lechner, H. and Marvin, D. A. : Filamentous bacterial viruses. I. DNA synthesis during the early stages of infection with fd. J. molec. Biol. 56 : 143-154, 1971
- 30) Kohn, D. and Thomas, M. : Control of plasmid replication in *E. coli* : Correlation of the membrane site of DNA replication with the bacterial segregation unit. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 68 : 2047-2051, 1971
- 31) Huberman, J. A. and Kornberg, A. : Stimulation of T4 bacteriophage DNA polymerase by the protein product of T4 gene 32. J. molec. Biol. 62 : 39-52, 1971
- 32) Gudas, L. J., James, R. and Pardee, A. B. : Evidence for the involvement of an outer membrane protein in DNA initiation. J. biol. Chem. 251 : 3470-3479, 1976
- 33) Donarchie, W. D. : Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. Nature, 219 : 1077-1079, 1968
- 34) Pritchard, R. H., Barth, P. T. and Collins, J. : Control of DNA synthesis in bacteria. Symp. Soc. gen. Microbiol. 19 : 293-298, 1969
- 35) Marvin, D. A. : Control of DNA replication by membrane. Nature, 219 : 485-486, 1968
- 36) Helmstetter, C. E. : Initiation of chromosome replication in *E. coli*. II. Analysis of the control mechanism. J. molec. Biol. 84 : 21-36, 1974
- 37) Blair, D. G., Clewell, D. B., Sheratt, D. J. and Helinski, D. R. : Strand specific supercoiled DNA-protein complexes of bacterial plasmids ColE1 and ColE2. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 68 : 210-214, 1971
- 38) Novick, R. : Plasmid-protein relaxation complexes in *Staphylococcus aureus*. J. Bact. 127 : 1177-1187, 1976
- 39) Kasamatsu, H. : 私信
- 40) Veltkamp, E. and Nijkamp, H. J. J. : Col DF13 DNA and nicking activity of the Clo DF13 plasmid specific protein. cloacin. 3rd Int. Symp. Antibiot. Resistance, at Smolenice Czechoslovakia, June 1976
- 41) Lovette, M. A. and Helinski, D. R. : Methods for the isolation of the replication region of a bacterial replicon : Construction of a mini-F'km plasmid. J. Bact. 127 : 982-987, 1976
- 42) Terawaki, Y. and Rownd, R. : Replication of the R factor Rts1 in *Proteus mirabilis*. J. Bact. 109 : 492-498, 1972
- 43) Terawaki, Y., Rownd, R. and Nakaya, R. : Effects of inhibition and restoration of protein synthesis on the replication of the R factor Rts1 in *Proteus mirabilis*. J. Bact. 117 : 687-695, 1974
- 44) Terawaki, Y., Kishi, H. and Nakaya, R. : Integration of R plasmid Rts1 to the *gal* region of the *E. coli* chromosome. J. Bact. 121 : 857-862, 1975
- 45) Terawaki, Y., Ishizu, K., Horiuchi, S., Goto, N. and Nakaya, R. : Control of replication and segregation of R plasmid Rts1. J. Bact. 128 : 693-700, 1976
- 46) Lewin, B. : Gene expression vol. 2, p. 7, John Wiley and Sons, London, 1974
- 47) 松原謙一 : プラスミッド, 分子レベルからみた微生物の遺伝, 講談社, 東京, 1976

(52. 2. 8 受稿)