



Title	Function of Single-stranded DNA-binding pro-tein of bacteriophage T7
Author(s)	清水, 喜久雄
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/2964165">https://doi.org/10.11501/2964165</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	し 清	みず 水	き 喜	く 久	お 雄
学位の種類	理	学	博	士	
学位記番号	第	9345		号	
学位授与の日付	平成	2年	10月	1日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当				
学位論文題目	Function of Single-stranded DNA-binding protein of bacteriophage T7 バクテリオファージT7の単鎖DNA結合蛋白質の機能				
論文審査委員	(主査) 教授	小川 英行		(副査) 教授	森田 敏照 教授 松原 謙一

## 論文内容の要旨

はじめに

バクテリオファージT7はそのDNA複製や組換えについて精力的に研究がなされ、各反応に関与する遺伝子の同定ならびに、突然変異株の単離がなされている。本研究では、DNA複製と組換えの両反応に関与している、単鎖DNA結合蛋白質(遺伝子2.5産物, ssb)の変異株を分離し、その解析より、この蛋白質の機能及び、ssbとT7ファージの他の蛋白質との相互作用について調べた。またssb蛋白質の発現調節についても明らかにした。

### I 遺伝子2.5の高温感受性株とアンバー変異株の単離

ニトロソグアニジン処理により高温感受性株(ts 2.5)を、また合成ヌクレオチドを用いた部位特異的突然変異導入法により、アンバー変異株(am 2.5-1及びam 2.5-2)を得た。am 2.5-1は15アミノ酸、またam 2.5-2は200アミノ酸からなるポリペプチドを生成する位置にアンバー変異を導入した。これら3つの変異株は、42℃あるいはアンバー抑制変異を持たない宿主中では生育出来なかった。また宿主である大腸菌が、それ自身の野生型のssb遺伝子を持っていても生育できなかった。このことは、以前考えられていたように、大腸菌のssbがT7ファージのssbに置き代わることが出来るというのではなく、T7 ssbはT7ファージの生育に必要不可欠であることを示している。

### II T7 up 2 変異株に存在する抑制変異の同定

前述のように、大腸菌ssbがT7ファージssbに置き代わると考えられ大腸菌のssb変異株を用いてT7のssb変異株が単離されていた。この変異株T7 up 2は野生型のssbを持った大腸菌では生育できるが、ssb-1やssb-113の変異を持った大腸菌では、生育出来ない。今回単離された変異株は

そのような大腸菌ssbに対する依存性がなく、T7 up 2 株には大腸菌ssb と作用する他の変異の存在が示唆された。ここでは、遺伝子操作によりT7 up 2 DNA と野生型DNAとのつなぎ代え及び遺伝的組換えにより、up 2 株に存在する、遺伝子2.5以外の変異を同定した。変異は2つあり、1つは遺伝子6（5'— エキソヌクレアーゼ'）内に他は遺伝子18（DNAの包み込みに関与）内に存在することが解った。これらの遺伝子産物はT7 ssbによりその活性が調節され、組換えやDNAの包み込みが進行すると考えられ、T7 up 2 株では、変異を起こした遺伝子6及び遺伝子18が大腸菌のssbによって活性化されていると考えられる。

### Ⅲ T7 遺伝子2.5の発現調節について

T7 フェージの遺伝子発現は大腸菌のRNAポリメラーゼで転写されるクラスI、T7のRNAポリメラーゼで転写されるクラスIIおよびⅢの3つに大別される。クラスIからクラスIIへの切り替えは大腸菌のRNAポリメラーゼの不活化とT7 RNAポリメラーゼの発現によって行なわれる。またクラスIIからクラスⅢへは、遺伝子3.5の産物であるリゾチームがT7 RNAポリメラーゼの活性をさげ転写をクラスIIプロモーターから、より強力なクラスⅢプロモーターへ変えることにより行なわれる。しかし、遺伝子3.5とは遺伝子2.5と同様に $\phi$  2.5プロモーターから転写され、クラスII遺伝子群の中では初期に転写される。従って、 $\phi$  2.5から転写される遺伝子群（遺伝子2.5、2.8、3及び3.8）の発現に関して何等かの調節機構の存在が考えられる。そこでこれら遺伝子群の内でもまだ変異株が存在せず、機能が不明な遺伝子2.8に注目し、そのアンバー変異株を単離（am 2.8-1とam 2.8-2）し、その解析を行なった。am 2.8-1は15アミノ酸またam 2.8-2は122アミノ酸からなるポリペプチドを生成すると期待される（野生型は139アミノ酸である）。各T7変異株と相補性試験を行なったところ、am 2.8-1は遺伝子1と、am 2.8-2は遺伝子2.5と相補しなかった。このことより、am 2.8-1では、 $\phi$  2.5遺伝子群が過剰に生産され、am 2.8-2ではそれらの発現が低減していると思われる。

## 論文審査の結果の要旨

一本鎖DNA結合蛋白質は、バクテリオファージを初めとしてあらゆる生物が持っており、遺伝子の複製や組換えに関与することで知られている重要な蛋白質である。しかしその機能については一本鎖DNAに結合する以外余り解析されていない。

清水君は、解析の容易なバクテリオファージT7の一本鎖DNA結合蛋白質（T7 ssb）を選び、分子遺伝学的手法を用いてつぎのことを明らかにした。

(1) T7 ssb はバクテリオファージ形成に必須で、大腸菌の一本鎖DNA結合蛋白質で置き換えることは出来ない。今までは両者のssbは互換性があると考えられており、本研究によって初めてこの問題に疑いなく決着が付けられた。

(2) T7 ssbは少なくともT7のエキソヌクレアーゼ（遺伝子6の産物）と遺伝子18の産物（DNAの包み込みに関与）と相互作用することが強く示唆された。

(3) T7ssb の変異の欠損は、さらに遺伝子6と遺伝子18に新しい変異が起こると、大腸菌の一本鎖DNA結合蛋白質によって置き換えられることが明らかになった。

(4) T7ssb の遺伝子2.5の隣の遺伝子2.8の変異を分離した結果、この遺伝子2.8の産物がT7ssbの発現を、転写後調節していることが示された。

これら一連のT7ssbに関する成果は、この蛋白質そのものの機能と合成制御の仕組みを明らかにしただけではなく、広く他の一本鎖DNA結合蛋白質の機能とその合成制御についても示唆を与えるもので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。