

Title	Biochemical studies on the transcription antitermination function of the N gene product of coliphage λ
Author(s)	Ishii, Shunsuke
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/27746
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	石 井 俊 輔
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 4 7 7 1 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 12 月 19 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	λファージN遺伝子産物の抗転写終結機能の生化学的研究
論文審査委員	(主査) 教 授 松代 愛三 (副査) 教 授 倉橋 潔 助教授 小川 英行 助教授 今本 文男

論 文 内 容 の 要 旨

λファージゲノムの転写は大腸菌RNAポリメラーゼによって行われるが、ファージのN遺伝子産物(Nタンパク)が存在しない場合には転写は開始まもなく停止してしまう。すなわちP_LやP_Rプロモーターから始まる転写はそれらの下流に位置するt_Lやt_R部位で停止し、この反応には大腸菌の転写終結因子ρが関与している。NタンパクはRNAポリメラーゼを何らかの形で修飾しρ因子に対する感受性を失わせると考えられており、この抗転写終結機能によってt_Lやt_R部位より下流の遺伝子(delayed-early)の転写が可能になる。このようにNタンパクは初期遺伝子から後期遺伝子への発現の切換えを行う鍵として作用すると考えられるが、Nタンパクの生化学的研究はほとんど行われていなかった。

我々は形質導入ファージλtrp DNAとλファージ溶原菌から得た粗抽出液を組み合わせたin vitroトリプトファンオペロン転写系を利用して転写レベルでNタンパクの抗転写終結活性を測定しうる系の確立に初めて成功した。この系を利用して(a)大腸菌トリプトファンオペロン中に存在する転写終結部位t⁺とファージに存在するt_L部位とを比較するとt_L部位の方が転写終結はより強く起こること、(b)転写終結部位の数が多いほど転写終結はより強く起こること等が明らかとなった。

この測定系を利用してλファージ溶原菌を材料としてNタンパクの精製を開始したが、量が少ないため完全精製は困難であった。そこでλファージDNAのN遺伝子を含むEco R1フラグメントをcol E1様プラスミドにin vitro組み換えの手法を用いてつなぎ、トランスフォーメーションにより大腸菌の中に入れたものを分離した。このプラスミド保持菌は野生型λファージ溶原菌の約50倍のNタンパク活性を有していた。これを材料にして硫酸分画、DEAE-Sephadex, Sephadex, ホスホセルロース各クロマトグラフィーによりNタンパクを純度約90%(SDS-電気泳動で判定)にまで精製した。分

分子量は約14,000であった。各クロマトグラフィーでの挙動から見てNタンパクはRNAポリメラーゼと弱く会合している部分の存在していることが示唆された。

DNA 鋳型として nut L変異を持つものを使用するとNタンパク活性は見られないこと、freeのNタンパクが活性を保持していることなどから、RNAポリメラーゼがnut部位でNタンパクにより何らかの修飾を受けるというモデルを提示した。

論文の審査結果の要旨

λ ファージの P_L プロモーターから開始されるNオペロンの転写は ρ 因子作用に由来する転写終結をおこさない。これはRNAポリメラーゼがNタンパク(pN)で修飾されることに原因している。pN作用の分子的機構を明らかにするために、本研究ではpNの抗転写終結活性のin vitro分析系の確立とpNの単離・精製が試みられ、次の結果を得ている。

(1)、 P_L のみからトリプトファン(trp)・オペロンが転写され、かつオペロン上流に1ケの転写終結信号が存在する λ trpファージを作成し、このDNAを鋳型として終結信号の下流に位置するtrpオペロンの転写量を測定することによってpN活性を定量できるようなin vitro転写系を確立した。

(2)、この系を用いて測定したpN活性を指標としてpNの単離・精製を行った。まず、N遺伝子をクローン化したpYS5プラスミドを用いてpN大量生産株を分離し、これを出発材料として2通りの方法によってpNを精製した。それぞれの方法によって得られたpNの最終標品はゲル電気泳動的に単一成分であって、純度は90%以上である。pNは塩基性タンパクで、耐熱性であり、分子量は約14,000 daltonsである。

(3)、pNはRNAポリメラーゼと作用するに際して、nus A and/or nus B遺伝子産物と複合体を形成することが必要であることが判明した。また、pN-nus 遺伝子産物複合体は P_L プロモーターのすぐ下流に位置する nut DNA sequenceと特異的に作用することによってRNAポリメラーゼに抗転写終結性を与えることが、in vitro転写系で確認された。

本研究は、pNの一次構造解析、およびpNによるRNAポリメラーゼ修飾の化学的機作などの解析に発展しうるものと思われる。

よって、学位論文の価値あるものと認定する。