

Title	trpR遺伝子転写の自己調節
Author(s)	西, 香代子
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33298
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	にし 西	か 香	よ 代	こ 子
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6000	号	
学位授与の日付	昭和58年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	trpR 遺伝子転写の自己調節			
論文審査委員	(主査) 教授	松代 愛三		
	(副査) 教授	近藤 宗平	教授	松原 謙一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

大腸菌の trp オペロンを負制御するアポリプレッサーは、染色体上 0 分に位置する trp R 遺伝子によってコードされている。R. L. Somervilleらは、trp R 遺伝子をクローニングし、DNA 一次構造を決定した結果、この遺伝子上流領域に、trp オペロンのオペレーター領域の DNA 塩基配列と類似の配列を見出した。このことより彼らは、trp R 遺伝子の発現が、自らの産物であるアポリプレッサーによって自己調節されていることを示唆した (MGG, vol.176, '79 Nuc. Acid. Res. vol.8 '80)。同様のことが、C. Yanofskyらによる trp R DNA断片を用いた in vitro 転写産物の解析の結果からも示唆された (PNAS, vol. 77, no.12 '80)。しかし、in vivo でこの自己調節がどのように行われているのか明らかでない。そこで、in vivo の trp R mRNA を調べることにより、trp R 遺伝子発現の自己調節機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

〔方法ならびに成績〕

野生株の trp R mRNA レベルは、非常に低く、ハイブリッド法による検出が困難であったので、種々の trpR 遺伝子をプラスミドにクローニングし、trpR mRNA レベルを増幅した系を確立した。すなわち、完全な trp R 遺伝子、プロモーター領域を有するが、後半部欠失の trpR 遺伝子断片、及びプロモーター領域と前半部を欠失した trpR 遺伝子断片をそれぞれ pBR322 にクローニングした。これらの雑種プラスミドをトランスフォームした trp R 欠失株を in vivo でパルスラベルすることにより、³H RNA を調製した。プローブとしては、M13mp7 フェージに完全な trpR 遺伝子の制限酵素断片をクローニングした DNA を使用した。以上の系を用い、trp R mRNA レベルを測定した結果、完全な trp R

を持つ株では、trp RmRNAレベルが、トリプトファンが存在で、非存在に比べ約30%の抑制を示した。またこのときtrpオペロンの遺伝子trpEDmRNAレベルは、トリプトファンが存在で、約55%の抑制を示していた。後半部欠失のtrpR断片を持つ株では、すなわち、完全なリプレッサーを合成できない株では、トリプトファンの有無で、trp R及びtrpEDmRNAレベルに差に認められなかった。また、プロモーター領域と前半部を欠くtrpR断片を持つ株では、trp RmRNAはほとんど検出されなかった。以上のことより、トリプトファンのアポリプレッサーは、コリプレッサーであるトリプトファン存在下で、自らの遺伝子発現を転写レベルで自己調節していることが結論できた。次に、trp R及びtrpEDのmRNA合成率の変化を調べた。まず、trp RmRNA合成率は、時間と共に上昇していくが、トリプトファン存在下での上昇は、非存在下に比べ常に、約35~55%低い値を示した。一方、trp EDmRNAの合成率は、トリプトファンにより約50~70%抑制されていた。このことは、trp R遺伝子の自己調節作用が、trpオペロンに対する調節作用に比較して緩慢であることが示唆され、trp R遺伝子先端領域とtrpオペレーターとのリプレッサーに対する親和性の相違を示していると思われる。次に、ショ糖密度勾配遠心法により、上記雑種プラスミド保持菌から得られるtrp RmRNAサイズを測定した。その結果、完全なtrp Rを持つ株より得られたtrp RmRNAは約450~500bの長さであり、DNA一次構造より推定されるプロモーター領域から転写終結信号までの距離420bと一致した。後半部欠失のtrp Rを持つ株からは、150~200bのtrp RmRNA断片が検出され、これも、DNA上でのプロモーター領域から欠失部までの170bと良く一致していた。以上のことから、このプラスミド系においては、プラスミド固有のプロモーターからのread throughはなく、trp R自身のプロモーターが働いていることが示され、結論として、in vivoにおけるtrp R遺伝子の発現が、転写レベルで自己調節されていることが明示された。

[総括]

trp R遺伝子が自らの遺伝子産物によって、転写レベルで自己調節されていることを、in vivoのtrp RmRNAレベルを測定することにより明らかにした。種々のtrp R遺伝子を担う雑種プラスミドを持つ株のtrp RmRNAをハイブリッド法により検出した。完全なtrp R遺伝子を持つ株では、コリプレッサーであるトリプトファンの存在により、trp RmRNAレベルが30~50%抑制され、不完全なtrp R遺伝子断片を持つ株では、短いtrp R mRNA断片は合成されるが、トリプトファンによる抑制は認められなかった。このことは、trp R遺伝子発現が転写レベルで自己調節されていることを示している。また、trp ED遺伝子に対する抑制効果と比較すると、trp R遺伝子の自己抑制は弱く、これは、トリプトファン存在下でオペロンが閉じられたときにも、リプレッサーの供給が必要であることの反映であると推論される。

論文の審査結果の要旨

制御遺伝子であるtrp Rの発現レベルは非常に低く、この遺伝子の自己調節を証明するために、他の

研究者たちは融合遺伝子を利用するなど間接的な解析を行っているが、本研究は、trpRmRNA 自体を直接解析することを目指している。本研究の成果は、クローニングにより、trpR 遺伝子を増幅することにより、trpRmRNA を直接解析する系の確立に成功し、さらにこの遺伝子の自己調節を証明したことにある。

本研究は、制御遺伝子転写産物を解析する上で、貴重な知見を提供するものであり、学位論文として価値あるものと認める。