The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	遺伝子発現におけるDNA超ラセン構造の役割
Author(s)	黒木, 和之
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33325
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【10】

氏名・(本籍)	黒木和之（くろき かずゆき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5983 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	**遺伝子発現におけるDNA超ラセン構造の役割**
論文審査委員	(主査) 教授 松代 愛三 (副査) 教授 松原 謙一　教授 近藤 宗平

論文内容の要旨

〔目　的〕

一般に，DNAは，大腸菌内では負の超ラセン構造を形成している。この高次構造は，DNAの複製や組換え反応のみならず，遺伝子の有効な発現にも必要であることが明らかとなってきた。遺伝子の転写においてDNAの高次構造が果している役割を分子レベルで理解するため，DNAの転写鋳型機能に及ぼすその超ラセン構造の効果をin vitro RNA合成系を用いて調べた。

〔方法ならびに成績〕

転写鋳型DNAには，λファージのP_Lプロモーターと大腸菌のトリプトファンオペロンとの融合遺伝子を持つpMT48プラスミドDNAを用いた（図）。又in vitro転写系には，精製したRNA polymerase holoenzymeによるRNA合成系と，よりin vivoに近い系として大腸菌細胞粗抽出液（S100）によるRNA合成系を使った。

in vitroでの遺伝子の転写活性は，塩濃度に大きく依存することが知られているので，超ラセン型および弛緩型pMT48DNAを鋳型として，KCl 10～400mMの範囲でRNA合成を行ない全RNA合成およびtrp mRNAとP_R-mRNA合成量を比較した。その結果，精製RNA polymerase系での至適KCl濃度は超ラセン型DNAで100～200mM，弛緩型DNAで100mMであった。又，転写鋳型機能のDNA高次構造依存性が，KCl濃度200mM以上でみられ，P_L-trp mRNA合成は，超ラセン型DNAで高く弛緩型で低かった。しかし，P_R -mRNA合成の高次構造依存性は低かった。これらの結果は，in vivoでみられる転写の高次構造依存性とよく一致している。

細胞粗抽出液（S100）を用いた系では，精製RNA polymeraseの系と同様至適塩濃度は超ラセン

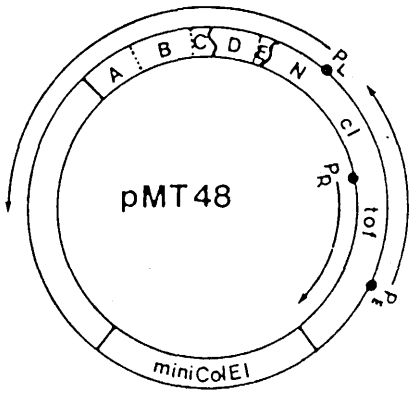
型ＤＮＡで高かった。又，精製RNA polymeraseの系と異なりいづれの塩濃度でも超ラセン型DNAの方が高い転写鋳型活性を示した。そして，RNA polymeraseの系に比べS100粗抽出液の系の方がより顕著に転写鋳型活性のＤＮＡ高次構造依存性がみられた。

DNAの高次構造と，RNA合成の初速度と伸長速度との関係を調べるため，精製RNA polymerase（KCl=200mM）系とS100粗抽出液（KCl=50mM）系を用いて，経時的にtrpmRNA合成量を測定した。どちらの系でも，trp mRNA合成の初速度・RNA鎖の伸長速度とも，超ラセン型DNAの方が弛緩型ＤＮＡを鋳型とした場合より高かった（それぞれ２～３倍，1.5～２倍）。超ラセン構造形成によるtrpmRNA合成の促進は，プロモーターとRNA polymeraseの結合速度及びRNA鎖の伸長速度がともに高められた結果であることがわかった。

pBR322プラスミドのβ-lactamase（Amp）遺伝子は，DNAの高次構造が解消され弛緩型になることにより逆にRNA合成が促進される。RNA合成のDNA高次構造依存性を解析する上で，Amp遺伝子のＲＮＡ合成についてこれまでに得られた知見を比較するのは重要である。そこで，RNA polymeraseの系を用いて，pNT7 DNAのAmp mRNA合成に対するDNA高次構造依存性を調べた。Amp mRNA合成量は，KCl濃度（10～400mM）にかかわりなく弛緩型DNAの方が超ラセン型より２～５倍多かった。これは，超ラセン型DNAに比べ弛緩型DNAのAmpプロモーターにより多くのRNA polymeraseが結合することを意味している。しかし，RNA合成の初速度及びRNA鎖の伸長速度については超ラセン型DNAの方が高く（２～３倍）pMT48 DNAを鋳型としたtrp mRNA合成の実験結果と一致した。

〔総　　括〕

DNAの負の超ラセン構造形成が遺伝子の効果的な発現に必要であることを２種のin vitro転写系を用いて示した。pMT48プラスミドを使ったin vivoの実験により，P_L-trp mRNA合成は，DNA高次構造に対する依存性が高く，一方，P_R-mRNA合成は依存性が低いことが示されたが，このプロモーター特異性は，いづれのin vitro転写系を用いても再現された。しかし，S100粗抽出液の系では，塩濃度にかかわりなく常に，超ラセン型DNAの方が転写鋳型活性が高いのに対してRNA polymeraseの系では，低塩濃度下で，DNAの高次構造依存性がない。これは，S100粗抽出液中に，超ラセン型DNAの転写鋳型活性を高めるか，あるいは，弛緩型の活性を抑制するprotein factor（s）の存在を示唆する。超ラセン型DNAでtrp mRNAの合成が促進されるのは，RNA合成の初速度とRNA鎖の伸長速度が高められた結果であることが結論された。一方，ＤＮＡ高次構造の解消によりRNA合成が高められるAmp遺伝子についても，RNA合成の初速度・RNA鎖の伸長速度共に，超ラセン型DNAで増加し，これらの効果は，ＤＮＡ高次構造の持つ特徴として共通のものであると考えられる。弛緩型DNAでのAmp mRNA合成



量の増加は，Ampプロモーターへの RNA polymerase結合量の増加，すなわち，RNA polymerase の結合部位がDNAの高次構造の解消により多くなったためと考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究は，大腸菌遺伝子の転写とDNAの高次構造についてプラスミドDNAと２つのin vitro転写系を用いて検討したものである。ＤＮＡは，負の超ラセン構造を形成することによりその転写鋳型活性を高めることを示した。それは，転写の初速度とともにＲＮＡ鎖の伸長速度が高くなった結果であり，遺伝子によりその程度が異なることを明らかにした。２つのin vitro系ではDNA 超ラセン構造の転写に対する効果に差が認められるがこれは，ＤＮＡの高次構造に関る因子の存在を示しており，大腸菌内ＤＮＡの存在様式を考える上で重要である。これは，今後の遺伝子発現の研究にあらたな視野をひろげるものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。