



Title	in vitro転写系におけるφ80Nタンパクの抗転写終結活性の研究
Author(s)	兼本, 晃二
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34607
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【4】

氏名・(本籍)	かね 兼	もと 本	こう 晃	じ 二
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	6771	号	
学位授与の日付	昭和60年	3月	25日	
学位授与の要件	理学研究科	生物化学専攻		
	学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	in vitro転写系におけるφ80Nタンパクの抗転写終結活性の研究			
論文審査委員	(主査) 教 授 松代 愛三	(副査) 教 授 倉橋 潔	教 授 小川 英行	教 授 松原 謙一

論文内容の要旨

φ80の初期遺伝子発現に重要な役割を担うと考えられるP_L, nutL, N, t_{L1}領域は塩基配列が決定され(田中, 松代), N, t_{L1}, nutL siteに関しては, trp promoter-galk遺伝子発現ベクター(pDR720)に, nutL, t_{L1} siteをそれぞれクローニングし, Nを組み込んだプラスミド(pRN1)の存在下, 非存在下でgalkの活性を測定するという方法で同定され, Nの抗転写終結活性がin vivoで証明された(田中, 松代)。

本研究の目的は, このN遺伝子産物の機能をin vitroで解析し, 同定することであり, さらに, Nタンパクを精製することにより, 抗転写終結の機構を解明することを目標とするものである。

まず, このN遺伝子を組み込んだpBR322(pBN1)を持つ菌よりS-100抽出液を調製して, それにφ80の初期領域(53~74%)をクローニングしたpACYC184(pKI4)を鋳型として加え, in vitro転写を行なった。t_{L1}の前後の配列をそれぞれM13mp9にクローニングしてprobeとし, DNA-RNA Hybrid形成法により, mRNAレベルで, Nの抗転写終結活性を定量した。その結果, N⁻S-100ではφタンパクの添加により, t_{L1}から下流のmRNA合成が著しく抑制されたのに対して, N⁺S-100では, φの存在下でもt_{L1}から下流への強いmRNA合成を示すことがわかった。この系を用いて, Nタンパクの精製を試みた。硫酸分画, DEAE-Sephadex chromatography後のSephadex-G150 chromatographyでは, 活性のピークが42Kと12Kに分かれた。このことは宿主タンパク因子と結合状態にあるNと, freeの状態で存在するNがあることを示唆している。さらに各々のピークの分画をCM-Sephadex C50 chromatographyで精製したところ, freeのNはSDSPAGEではほぼ単一バンド(精製度93%以上)に精製された。さらに, NH₂末端のアミノ酸配列を気相式シーケンサーによって6個決定したところ, DNAの塩基配列よ

り推定されるアミノ酸配列と一致した。このことより、精製されたこのタンパクはN遺伝子産物であるということが確認された。

一方42Kの分画は、CM-Sephadex C50 chromatographyにひきつづいて、熱処理を行うことにより、11.7 Kと15Kのタンパクとして90%の純度で精製できた。これらのタンパクの量比はほぼ2:1で、SDSを含まないアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを示すことから、この複合体は、Nが2分子に対し、15Kのタンパク1分子の割合で構成されると思われる。又、この結果は、Nが抗転写終結活性を発揮するためには、少なくとも上記の様な複合体を形成する必要があることを示唆する。

論文の審査結果の要旨

これまで ϕ 80ではNの突然変異株が得られておらず ϕ 80のLytic cycleの制御系は不明な点が多かった。つい最近in vivoの実験で ϕ 80N遺伝子が同定された(田中、松代)。この論文はin vitroのmRNAレベルでN遺伝子産物の抗転写終結活性を明らかにした。又Nタンパクを精製し、NH₂末端のアミノ酸配列を決めるこことによりN遺伝子産物として直接同定した。さらにt_{L1} terminatorがρ-dependent terminatorであり、P_L promoterから転写されt_{L1}で止まる0.95 KbのRNA及びNの抗転写終結作用でt_{L1} terminatorをのりこえた長いmRNAの存在も証明された。これらの事実から少なくとも ϕ 80ファージの初期遺伝子発現に重要な役割を担っているP_L-nutL-N-t_{L1}領域はλファージと遺伝子構成、配列、機能等がよく似ていると言える。また ϕ 80NタンパクとλNタンパクと比較した場合、アミノ酸配列の相同意性はほとんどないものの、λ同様塩基性であり、抗転写終結作用を示す点も同様であることが示された。しかしNタンパクがその機能を発揮する上で必要とされる宿主因子について調べるとλNタンパクと ϕ 80Nタンパクには差異があることが本論文で示された。つまりλNタンパクはin vitroの実験より大腸菌の因子であるnusA、nusB、nusE遺伝子産物が抗転写終結作用に必須であり、λNタンパク精製過程においてNとnusAタンパクがComplexを形成していることが示されている。一方 ϕ 80Nタンパクについて見ると精製過程で同定されたComplexはNタンパクと15Kdの分子量をもつ宿主タンパクが2:1の割合で結合していると考えられるものであり ϕ 80ファージはλファージと違いnusA⁻、nusC⁻、nusE⁻株によく生えnusB⁻株では生えないことやnusB遺伝子産物と分子量がほぼ一致することなどからこの15KdタンパクがnusBタンパクであることが示唆された。以上のように ϕ 80Nの関与する初期遺伝子発現の調節機構を解明したことは重要な成果であり、理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認める。