



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、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

【4】

氏名・（本籍）	かねもとこうじ 兼 本 晃 二
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 6 7 7 1 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 ϕ 80N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

ϕ 80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 ϕ 80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-RNAHybrid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 ρ 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, ρ 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-Sephacel 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では単一バンド(精製度93%以上)に精製された。さらに, NH_2 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 $\phi 80$ ではNの突然変異株が得られておらず $\phi 80$ 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 $\phi 80$ N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 $\phi 80$ 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 $\phi 80$ Nタンパクと λ Nタンパクと比較した場合、アミノ酸配列の相同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 λ Nタンパクと $\phi 80$ N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 λ N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、 λ N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 $\phi 80$ N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 $\phi 80$ 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 $\phi 80$ N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。