



Title	in vitro系で. 転写の方向性がλ DNA複製に及ぼす影響
Author(s)	幸原, 晴彦
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36035
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

【6】

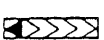
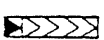
氏名・(本籍)	こう 幸	はら 原	はる 晴	ひこ 彦
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8 5 7 6	号	
学位授与の日付	平成元年	3 月	24 日	
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	in vitro系で、転写の方向性がλDNA複製に及ぼす影響			
論文審査委員	(主査) 教授 松原 謙一			
	(副査) 教授 吉川 寛	教授 松代 愛三		

論文内容の要旨

〔目的〕

λ DNA複製には、転写活性化のためRNA polymerase による複製開始点近傍の転写が必須である。転写の方向性がDNA複製に、どのような影響を及ぼすかをみるためには、他の複製系及び転写系の影響を除いた系が必要となる。本研究ではchloramphenicol acetyl transferase遺伝子(以下CAT遺伝子と略)、lactose promoter(以下placと略)及びλ最小複製領域(以下λoriと略)よりのみなる人工環状複製体(plasmoid)を作成し、これら三種の遺伝子の方向性を変えたplasmoidを、λの複製開始蛋白であるO及びP蛋白を追加した大腸菌のin vitro DNA合成系で複製させた。そのDNA合成量を比較検討し、転写の方向性との関連を調べた。

〔方法〕

plasmoidの作成-plasmoid C, L, CX, CY, LX, LYは、1) 775bp CAT遺伝子()。2) 178bp λori()、3) 99bp plac()をそれぞれ C:  , L:  , CX:  , CY:  , LX:  , LY:  の組み合わせでつなぎ合わせた。(矢印の方向は5'→3'を表す)これらをそれぞれpBR322由来のベクターでクローニング後切り出し、1μg/mlの濃度にて1μg/mlのエチジウムブロマイド存在下で環状化しDNA複製の鋳型とした。

in vitro DNA複製及び転写活性の測定-Ori C plasmidのin vitro DNA合成系(Fuller et al 1981)にλの複製開始蛋白であるO及びP蛋白を追加した系(Tsurimoto et al 1982)では、λdv plasmidのDNA複製が可能である。この系を用い、plasmoidを複製させ、TCA沈澱後〔α-

^{32}P dCTPの酸不溶性画分への取り込みでDNA合成を、 $(\alpha - ^{32}\text{P})$ UTPの酸不溶性画分への取り込みでRNA合成を測定した。またこのとき、E.coli K12株BMH461より精製したラクトースリプレッサーを加えDNA及びRNA合成に与える影響を調べた。

strand specific DNA合成及びRNA合成— $(\alpha - ^{32}\text{P})$ dCTP又は $(\alpha - ^{32}\text{P})$ UTP存在下でplasmoidを複製させそれを除蛋白後変性させた。これをCAT遺伝子の各々の鎖の一本鎖DNAをニトロセルロースに固定したものに対してハイブリダイズさせ、それぞれの鎖の合成割合を調べた。

〔成績〕

① plasmoidが複製するかどうかの基礎チェックのため、 λ dv plasmidのdeletion mutantのDNA複製能を調べた。wild type (3.1 kb) のcut and ligation では、 λ dv plasmid に比べ65%、1.2 kb欠失では53%、1.9 kb欠失では54%の複製能であった。

② それぞれのplasmoidの転写能を調べたところ、placの方向に順じて転写活性が認められた。これは λ ori及びCAT遺伝子の方向には非依存性であった。ラクトースリプレッサー存在下では、placよりの強力な転写は抑制されたが、プロモーターとは無関係な弱い転写が両方向に存在した。これらは、in vitro系では強い転写によって抑制されていたものが、cryptic promoterより転写されたものと思われる。このようなplasmoidの転写下で、 λ oriと転写の方向性がどのように影響するかを以下のようにして調べた。

③ placと λ ori が転写に関して同方向に配列しているCX及びLYでは、ラクトースリプレッサー非存在下の方が存在下に比べ約2倍のDNA合成能を示した。placと λ ori が反対方向であるCY及びLYでは、ラクトースリプレッサーに無関係に一定の値を示し、ラクトースリプレッサー存在下のCX及びLYと同程度であった。これより、 λ oriのDNA合成開始には、転写に関して方向性があり、順方向で効率よく働くということを示している。

④ plasmoidのDNA合成のstrand specificityに関して、DNA合成後のそれぞれの鎖の合成割合を調べたところ、LY及びCYともplacよりの強い転写があるときは、転写と同方向の鎖の合成が約2倍あった。ラクトースリプレッサー存在下ではこの差はみられなかった。このことは、強い転写の存在下では、DNA合成の割合に差が出ることを示している。

〔総括〕

DNA複製開始領域を通過する順方向及び逆方向からの転写が、DNA合成能にどのような影響を及ぼすかを、人工環状複製体(plasmoid)を使い検討した。これよりDNA複製開始領域には、転写が λ oriの本来の転写と同方向の方が、逆方向の場合よりDNA合成能が大であることがわかった。また強力な転写下では、DNA各鎖の合成に差があることがわかった。

論文の審査結果の要旨

本研究では、 λ DNA 複製における転写の影響を調べるため、ラクトースプロモーター、 λ ori、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子以外の転写系及び複製系を全く含まず、かつプラスミドと同じように超らせん構造を持つ人工環状 DNA（プラスモイド）を鋳型として用いた。これは今までになかった新しい試みである。この系を用いることにより、本来の転写方向より RNA ポリメラーゼが λ ori 近傍を通過する場合の方が、逆の場合と比べてより効率よく DNA 複製するということを解明した。転写の方向性と DNA 複製を *in vitro* 系で解析した研究は今までになく、今後の発展に寄与するところは大きいと思われる。