



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | バクテリオファージφ欠番174のゲノムにコードされているmRNA安定性に関する塩基配列                                                                                                                                                                                                                          |
| Author(s)    | 林, マリエ                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 1989, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/36712">https://hdl.handle.net/11094/36712</a>                                                                                                                                                                                  |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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

|         |                                                                |
|---------|----------------------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | はやし<br>林 マ リ エ                                                 |
| 学位の種類   | 医 学 博 士                                                        |
| 学位記番号   | 第 8 4 7 4 号                                                    |
| 学位授与の日付 | 平成元年3月2日                                                       |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当                                                   |
| 学位論文題目  | バクテリオファージ $\phi \times 174$ のゲノムにコードされている<br>mRNA 安定性に関与する塩基配列 |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 吉川 寛<br>(副査)<br>教授 松代 愛三 教授 谷口 維紹                   |

## 論文内容の要旨

### 〔目 的〕

大腸菌ファージの一つである  $\phi \times 174$  (以下  $\phi \times$ ) はその環状ゲノム上に3個所の転写 promoter (PA, PB, PD) 及び4箇所の terminator (TJ, TF, TG, TH) が存在し, PB と PD から出発した mRNA は4箇所のどれかの terminator で終る。これらの mRNA は機能的に (したがって化学的に) 比較的安定である。一方, PA からの mRNA は不安定で半減期1分の割合で崩壊する。 $\phi \times$  mRNA の機能的安定性を検討するのがこの一連の研究の目的である。

我々は前に TJ (すなわち mRNA 3' 末端) の deletion 及び insertion 変異株で, TJ の上流にある遺伝子 mRNA の安定性を調べた。その結果, これらの変異株は2グループに分けられた。グループ1(+) は野生株と同様に mRNA の安定性がある。グループ2 (一型) は TJ で読了された mRNA が急速に分解されて安定性が減少する。すなわち, mRNA 3' 末端に安定性を決定する塩基配列がある。

前述した様に TF, TG, TH で終る mRNA も安定化されるのでこれらの部分にも安定化のシグナルがあると考えられる。本論文は, (1)安定化シグナルの正確な位置, (2)この部分のクローン化, (3)安定化の機構解明, を主目的とする。

### 〔方法ならびに成績〕

方法:(1)クローニング pBR322 を母体として高温で不活性化するラムダCI 蛋白及び PR promoter を入れその下流に mp8 の mcs を接続する。 $\phi \times$  B または D 遺伝子の promoter を切断した構造蛋白部分を mcs EcoRI と BamHI に入れる。残りの mcs 部分及び pBR322 の EcoRV を使って  $\phi \times$  からのシグナルを正, 逆または重複状に入れた。

(2)mRNA 3'末端はS1マップ法で決定した。

(3)mRNA 崩壊の半減期は、プラスミドを含む菌を高温で誘導し、H<sup>3</sup>ウリジンでパルスし、rifampicin存在下で各時点よりRNAを分離、BまたはD遺伝子を含むDNAフラグメントとハイブリッドを作り崩壊カーブを作った。mRNAの蛋白合成能はrifampicin存在下で全蛋白をS<sup>35</sup>メチオニンでラベルしSDS-PAGEにより分離されたB又はD蛋白バンドをカウントした。

成績：(1)シグナルの位置：φ×感染菌より全RNAを抽出しS1マップした結果、安定な3'末端はT<sub>J</sub> 988, T<sub>F</sub> 2348, T<sub>G</sub> 3021, T<sub>H</sub> 3978にある。この領域には(a)ヘアピン構造(b)GGUA...UAAUUU(又はその誘導体)(c)16Sリボソーム3'末端と相補性の塩基配列がある。これは次の遺伝子のRBSではなく(T<sub>H</sub>以外)RBSは別に存在する。

(2)mRNAの半減期：クローンした(+)型T<sub>J</sub>は7〜8分、(-)型は2〜2.2分、(0)型は1.4〜2分であった。(+)及び(-)型はその上流の遺伝子にのみ作用する。(CIS dominant)。

(3)mRNAの蛋白合成能：T<sub>J</sub>, T<sub>F</sub>, T<sub>G</sub>, T<sub>H</sub>を逆向きに挿入したクローンを対照とした時、正しい向きのクローンの蛋白合成能は3〜20倍高かった。T<sub>G</sub>のみは感染菌の結果と同様安定化が低かった。

(4)重複シグナル：表に示した如くクローンした。(+)又は(-)シグナルはterminatorとして働く。B及

| クローン | シグナル | 蛋白合成 |
|------|------|------|
| A    | 0    | 5    |
| B    | +    | 100  |
| C    | -    | 20   |
| D    | + +  | 130  |
| E    | + -  | 115  |
| F    | - +  | 50   |
| G    | +    | 4    |
|      | ←    |      |
| H    | + +  | 10   |
|      | ← →  |      |

びCクローンには一個所、重複クローンには二箇所の3'末端がS1マップによって見い出された。Terminationは70%の効率で働く。故にBは70%のRNAがシグナルでterminateし安定となる。30%はread-throughをする。Eも同様であるがread-throughは次の(-)で70% terminateし、この部分は3'末端より分解され、(+)の所で止まり安定化する。Dは最初の(+)で70%安定化し、次の(+)でread-throughの70%が安定化する。Fは最初の(-)で70%不安定化、read-throughの内の70%が安定化するので蛋白合成能はB〜Fのうちに一番低い。(+)を逆に挿入すれば安定化が見られず、更にその下流に(+)を入れても働かない。多分二つのシグナルは高次構造を作りやすくなるのであろう。

#### (総括)

mRNA安定性制御に関する研究は近年著しく活発になった。その理由は、安定性を支配する機構が今まで考えられていたよりもはるかに複雑多様にわたることが分かったためである。もっとも重要な結論はそれぞれの遺伝子又はオペロンにより異なった機構をとるという事実である。

mRNAの分解には種々のモデルがある。第一は5'→3'分解モデルであるが5'→3'RNAaseはまだ発見されていない。この場合は5'付近のpromoter, RBSに安定化制御機構があることが多い。第二には3'→5'分解で、しばしば3'末端のシグナルによって安定化する(Retroregulation)。φ×のPB, PDより始まりT<sub>J</sub>, T<sub>F</sub>, T<sub>G</sub>, T<sub>H</sub>で終るmRNAは、3'末端の構造に安定化を支配するシグ

ナルがある。この機構を持つ mRNA は他にいくつか知られているが、3' 末端が 5' RBS をも同時に保護しなければならない。このメカニズムの解明が次の重要な問題の一つとなろう。

## 論文の審査結果の要旨

メッセンジャー RNA (mRNA) の寿命 (安定性) は遺伝子の発現調節の重要な部分を占めているが、その代謝の分子機構は殆ど分かっていない。最近その複雑さと多様性が注目されている。

林マリエさんは、大腸菌のバクテリオファージ  $\phi \times 174$  が合成する寿命の長い mRNA について解析し、3'-端に存在する特異的なヘアピン構造を作る配列が安定性に関与することを発見した。次にこの安定化配列をクローニングし、特定の蛋白のコード配列の下流に接続した人工遺伝子を用いて、mRNA の安定性、蛋白合成量に対する配列の構造、配置 (方向性) 及び重複度の効果を調べた。その結果、1) 安定化配列は転写終結シグナルのすぐ上流に存在し、挿入変異により失活する、2) 安定度は配列の数に比列する、3) 終結シグナルを安定化配列の下流に付加すると安定性は増加し、上流に加えると減少する、4) 配列は一方向 (自然の方向) のみ有効である、を明らかにした。

以上のことは、mRNA は転写終結部位から 3'  $\rightarrow$  5' 方向に分解され、ヘアピン構造によって分解が阻止されることを示している。

本研究は mRNA の安定性に関与する DNA 配列の構造と機能の解析によって、安定化の分子機構を明らかにしたもので、遺伝情報発現の調節の理解に貢献する研究であると評価できる。