The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	高度好熱菌 Thermus thermophilus HB 8 由来のポリペプチド鎖延長因子（EF-Tu,EF-G）を含むオペロンの解析
Author(s)	久代，明
Citation	大阪大学，1990，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37050
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)	久代　明（くしろ　あさら）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 9143 号
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 24 日
学位授与の要件	薬学研究科薬品化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB 8 由来のポリペプチド鎖延長因子(EF−Tu, EF−G)を含むオペロンの解析**
論文審査委員	(主査) 教授 冨田 研一 (副査) 教授 今西 武　教授 岩田 宙造　教授 北川 勲

論文内容の要旨

70℃以上でも生育可能な高度好熱菌Thermus thermophilus HB8よりポリペプチド鎖延長因子EF−Tuをコードする遺伝子を2個（tufA遺伝子，tufB遺伝子）クローニングした。tufA遺伝子の5'末端上流にはEF−Gをコードするfus 遺伝子があり，tufB遺伝子の5'末端上流にはtRNAをコードする遺伝子群が並んでいた。T. thermophilus HB8のEF−Tuは405 アミノ酸残基より成り，分子量は45 KDaであった。大腸菌とT. thermophilus HB8のEF−Tu のアミノ酸配列の相同性は70.4%であった。好熱菌のtuf遺伝子のG+C含量は62.9%，コドン3文字目のG+C含量は84.5%と高く，好熱菌の染色体DNAは強くG+C pressureを受けている事がわかる。tufA 遺伝子とtufB 遺伝子を比較した所，11箇所で塩基置換が起こっており，そのうち5箇所でアミノ酸置換（保存性のあるアミノ酸置換は3箇所）が起こっていた。終止コドンもUGA（tufA遺伝子）⟷ UAA（tufB遺伝子）に変化していた。G+C pressure の強くかかったバクテリアにおいてUAAが終止コドンとして機能している例が見つかった。大腸菌のEF−Tuのアミノ酸配列に対応しない配列がT. thermophilus HB8のEF−Tu中で見出された。それはMet−182〜Gly−191 の配列で，この周辺領域は非常に親水性に富み，且つ10アミノ酸残基中5個が塩基性アミノ酸であるなど特徴的な配列であった。又，この配列は大腸菌のEF−Tu においてはαヘリックスとαヘリックスを結ぶループにあたる事を考慮に入れると，この部分が溶媒側に露出して負に荷電した基質（例えばリン酸基など）と相互作用をしているものと思われる。次にT. thermophilus HB8のtufA遺伝子の大腸菌内における発現を試みた。発現ベクターとしてトリプトファンプロモーター（trp promoter）を有し，trp promoterの下流に多くの制限酵素切断部位を有するプラスミドpKH9を作成した。これにT. thermophilus

HB8 のtufA遺伝子を組込み，大腸菌に形質転換し，発現を行なった。発現量としては大腸菌の総蛋白質量の7～8％であった。次にこの発現されたT. thermophilus HB8のEF−Tu が大腸菌内で機能しうるかを調べた。方法としては大腸菌のtuf 遺伝子に変異が起こり，抗生物質キロマイシンに対し耐性を示す変異体LBE2012 を用いた。この変異体に正常なtuf 遺伝子が導入され，正常なEF−Tu が発現され，機能するとキロマイシンに対し感受性を示す様になる。そこでT. thermophilus HB8 のtufA 遺伝子を発現ベクターに組込んだプラスミドをこの変異体に導入した所，表現型がキロマイシン耐性からキロマイシン感受性に変化した。この事よりT. thermophilus HB8のtufA 遺伝子が大腸菌内で発現され，機能している事が判明した。次にtufA遺伝子が含まれているストレプトマイシンオペロン（strオペロン）のクローニングを行なった。このオペロンはリボゾーム蛋白質S12遺伝子(rpsL遺伝子)，S7蛋白質遺伝子（rpsG遺伝子），EF−G遺伝子（fus遺伝子），EF−Tu遺伝子（tufA遺伝子）より構成されていた。このオペロンのプロモーター配列としてはrpsL遺伝子の5'末端上流に大腸菌のプロモーター配列と相同性の高いTTGCCA（−35領域），TACACT（−10領域）配列が見つかった。SD配列は各遺伝子の開始コドンより5～6塩基上流にみいだされたが，rpsG遺伝子のSD配列とrpsL遺伝子の3'末端の構造遺伝子とが，またfus遺伝子のSD配列とrpsG遺伝子の3'末端の構造遺伝子とが重なり合ったコンパクトな遺伝子構成を取っていた。アミノ酸配列を比較した所，大腸菌で用いられていたCys残基はT. thermophilus HB8ではVal，Ala残基に置換されているのが目についた。コドン使用頻度は3文字目がGまたはCであるコドンが多く用いられていた。しかし，fus遺伝子とtuf遺伝子のPheのIleのコドンとしては3文字目がUであるUUU，AUU が用いられる場合が目立った。その理由としてはT. thermophilus HB8は制限酵素TthHBIを産生し，その認識配列はTCGAである。もし，PheとIleのコドンとして N_1 UC(N_1 =A or U)が用いられると，(Phe or Ile)−(Asp or Glu) をコードする際，N_1 TCGAN_2 (N_2=A, G, C, and T) となり，TCGA 配列が現われてしまう。この様な場合UUU/AUU コドンが選択的に使用されると推定できる。fus 遺伝子ではUUU/AUUコドンが12回，tufA遺伝子では23回使われたが，そのうち上記の理由で説明できたのはfus遺伝子では11回あったが，tufA遺伝子では4回に過ぎず，残りの19回についてはいまだ説明がつけられない。次にT. thermophilus HB8のstrオペロンの遺伝子発現の制御機構についての考察を加えた。T. thermophilus HB8と大腸菌の16S rRNAの2次構造は良く似ておりS7蛋白質はU−1222に結合すると思われる。大腸菌ではrpsL遺伝子とrpsG遺伝子の間の領域(intercistronic region)が16S rRNAの2次構造と似た構造を取り，S7蛋白質が16SrRNAだけでなくmRNAにも結合し，rpsG 遺伝子の発現を制御していると考えられている。T. thermo−philus HB8の場合では，rpsL遺伝子の5'末端領域のmRNAが16S rRNA の2次構造に似た構造を取りうる事がコンピュータ検策より明らかになった。この事よりS7蛋白質はrpsL 遺伝子のmRNAに結合し，rpsL 遺伝子のみ，あるいはrpsL遺伝子及びrpsG遺伝子両方の翻訳段階でのリプレッサーとして働いている可能性があると考えた。最後にrpsG遺伝子の5'末端周辺領域では purine−base rich な塩基配列が130塩基中に4回繰り返されていた。さらに，この繰り返し配列中にはnon-optimal codon が多く含まれていた。この意味としては翻訳速度を減少し、rpsG 遺伝子または，その下流の遺伝

子の翻訳を制御している可能性や繰り返し配列が形成するループ構造に何らかの意味があるように思われる。

論文の審査結果の要旨

久代君は，高度好熱菌Thermus thermophilus HB8 由来のポリペプチド鎖延長因子のクローニング，大腸菌内での発現およびストレプトマイシンオペロン遺伝子の解析などを行ない，遺伝子発現の制御機構，使用コドンの特異性など多くの新しい知見を得た。

以上の研究は，分子生物学や蛋白質生合成分野に多大の貢献をしたものと認め，薬学博士の学位請求に十分値するものである。