



Title	Control of ColE2 DNA replication : Regulation of expression of the replication protein Rep by antisense RNA
Author(s)	杉山, 智彦
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38097
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

氏名	杉山智彦
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第10360号
学位授与年月日	平成4年6月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科 生理学専攻
学位論文名	Control of CoIE2 DNA replication : Regulation of expression of the replication protein Rep by antisense RNA (アンチセンス RNA による CoIE2 プラスミド複製開始蛋白 Rep の発現制御機構) (主査) 教授 小川 英行 (副査) 教授 森田 敏照 助教授 伊藤 建夫
論文審査委員	

論文内容の要旨

大腸菌内プラスミドである CoIE2 の複製にはプラスミド自身にコードされる Rep 蛋白が必要である。このプラスミドのコピー数（細胞内のプラスミド分子数）は Rep 蛋白の発現量に依存している。Rep 蛋白の発現量は rep 遺伝子の5' 非翻訳領域に相補的な約115ヌクレオチドの RNA である RNAI によって転写後の段階で負に調節されている。

私は、精製された RNAI と Rep-mRNA の試験管内での相互作用を観察し、両者は試験管内の生理的条件下で速やかに結合することを示した。一塩基置換によりこの結合速度は大きく低下し、この低下の程度が、同様の塩基置換を持つ変異体の細胞内での表現型とよく対応した。5' 末端から様々な長さの欠失を持つ RNAI 誘導体を用いた同様の試験管内の実験から、RNAI と Rep-mRNA の結合はまずこれらの RNA のステムループ構造のループ部分で最初の相互作用が起こり、その後ステムループ構造の外の一本鎖部分が核となって二重鎖形成が起こることがわかった。また私は、精製された RNAI は試験管内の蛋白合成系での Rep 蛋白の発現と試験管内の CoIE2 DNA 複製を阻害することを示した。5' 末端から40ヌクレオチド以上の欠失を持つ RNAI 誘導体も、Rep-mRNA に対する結合速度に応じた濃度で、CoIE2 DNA 複製を阻害した。このことから、Rep 蛋白の発現調節には、翻訳開始コドンの80ヌクレオチド以上上流の領域が関与していることがわかった。また、様々な突然変異を持つrep-lacZ融合遺伝子の発現を測定することにより、Rep 蛋白の発現には、上記の領域と、翻訳開始コドンの下流数十塩基の領域の二つが必要であることがわかった。さらに、これらの二つの領域間に一部相補的な領域があり、それらの間の相補性を失わせると Rep 蛋白の発現量が低下し、相補性を回復させると、発現量が部分的に回復することが示された。様々な RNase を用いた Rep-mRNA の限定加水分解による情報とコンピューターによる RNA 二次構造予測の結果から、Rep-mRNA の二次構造を推定したところ、上記の相補的な領域は二つのステムループ領域のループ部分に存在することがわかった。

これらの実験結果に基き、RNAI による Rep 蛋白の発現調節機構のモデルを構築した。即ち、Rep-mRNA の効率の良い翻訳のためには特殊な三次構造をとることが必要であり、その構造の維持には、RNAI と相補的な領域内にあるステムループ構造のループの一部と Rep 蛋白の翻訳開始コドンよりも下流にある領域の間での相互作用が関与している。RNAI が Rep-mRNA に結合する過程で、ループ同士でおこなう最初の相互作用の段階では Rep 蛋白の翻訳

は阻害されないが、核形成から完全な二重鎖の形成に至る過程で、Rep-mRNA の三次構造が変化し、翻訳に必要な構造が破壊され、Rep 蛋白の発現が阻害される。

論文審査の結果の要旨

ColE2 プラスミドの DNA 複製開始は、プラスミドのコードするプライマース、Rep 蛋白質によって行なわれる。Rep 蛋白質の発現は、同じくプラスミドがコードするアンチセンス RNA、RNAI によって制御されている。杉山君は Rep 蛋白質の mRNA と RNAI との相互作用を試験管内の系で直接解析して、RNAI の立体構造が制御に重要であることと、翻訳段階で制御していることを明確に示した。この成果は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。