

| | |
|----------|-------------------------------|
| 氏名 | ほりぐちだいご 堀 口 大 吾 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (理 学) |
| 学位記番号 | 理 博 第 1873 号 |
| 学位授与の日付 | 平 成 9 年 9 月 24 日 |
| 学位授与の要件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当 |
| 研究科・専攻 | 理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻 |
| 学位論文題目 | 大腸菌転写終結因子 ρ の構造と機能に関する研究 |

論文調査委員 (主 査) 教授 梅 園 和 彦 教授 山 岸 秀 夫 教授 藤 吉 好 則

論 文 内 容 の 要 旨

申請論文は遺伝子の転写を DNA 上の特定の位置で停止させる機能を担うことで知られる大腸菌転写終結因子 ρ を取り上げて、その作用機構を分子遺伝学的ならびに生化学的手法により研究したものである。

これまで、 ρ は分子量約5万の単一サブユニットからなる環状の六量体であり、転写中の新生 RNA 鎖に結合し、ATPの加水分解のエネルギーを利用して RNA ポリメラーゼから RNA 鎖を強制的に引き離すという、複雑な機構で働くことが分かっていたが、その分子レベルでの詳しい作用機構は不明であった。この問題を追究するための糸口として、申請者はまず ρ 蛋白の系統的な変異導入解析を行った。また、並行的に ρ 蛋白の精製を効率化するために ρ 因子にヒスチジン・タグを導入して強制発現させアフィニティー・カラムによって増産させるベクターシステムを開発した。これらの手法を組み合わせることにより多数の変異 ρ 蛋白を分離して詳細な性格付けを行った。

次いで、 ρ 因子依存性の転写終結の促進因子として働くことが知られている NusG 蛋白の変異 ρ 蛋白に対する機能的影響について解析した。先に得られた変異 ρ 蛋白の多くは単独ではほとんど転写終結活性を示さなくなっていたが NusG 共存下では有意に活性を回復した。他方、少数例として NusG に依存することなく強い転写活性を示すものも見出された。これらの結果から ρ と NusG との相互作用とその役割について重要な手掛かりが得られた。

さらに、 ρ 蛋白の六量体上における空間配置について解析を進めた。これまで ρ は D3 シンメトリーを取ると考えられていたが、申請者は一次構造上 ρ と近縁な F1-ATPase が C6 シンメトリーを取ることから、従来の説に疑問を持ち、その再検討を行った。そのために様々な長さの化学的架橋剤を用いてクロスリンク実験を行い、得られた詳細なデータを数理モデルを用いて理論的に解析した。その結果 ρ はやはり F1-ATPase と同様に C6 シンメトリー構造を取ることが確認された。この結論は先に得られた変異 ρ の示す性質が D3 シンメトリーではなく C6 シンメトリー構造により矛盾なく説明できることから裏付けられた。これらの結果を総合して申請者は RNA が ρ 六量体の中心孔を通過してたぐり寄せられるという新しい作用機構モデルを提示した。

なお、参考論文は上記の変異解析の基礎となった選択システムの構築とその特性について述べたものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞の染色体上には多数の遺伝子が分節状に配列している。従って、個々の遺伝子あるいは遺伝子群の発現を秩序正しく進行させるには、その第一段階である RNA 鎖への転写において、開始と終結がそれぞれ適切な位置と頻度で起こるように調節することが必要である。このうち、転写開始を制御する機構については解明が相当進んでいるが、転写終結の研究は遅れがちであった。こうした背景の中で申請者は、後者に関与する因子として古くから知られていながら作用機構が謎であった大腸菌の ρ 蛋白をとりあげて、その解明に挑戦した。

ρ 蛋白の基本的性状と分子活性は既に良く解析されており、その反応様式についても RNA 鎖を直接の作用標的とし

ATP 水解エネルギーを利用してそれを RNA ポリメラーゼから能動的に引き離すという極めてユニークなものであることまで分かっていた。しかしその分子レベルでの詳しい機構は不明であった。また、 ρ の一次構造は、 ρ とは機能的に一見無縁と思える F1-ATPase のそれに相同であることが知られていたが、その機構的意義は全く謎であった。申請者は ρ 蛋白の系統的なランダム変異導入解析を基軸としてこれらの問題への接近を試み、実際に多数の変異 ρ 蛋白を分離して、変異部位と機能的変化の間を詳細に解析した。その結果、 ρ と F1-ATPase は単に一次構造が似ているだけでなく、両者は六量体 ATPase として基本的に同じ高次構造並びに反応機構を共有していることがまず明らかになった。そこから敷衍される一つの重要な帰結として、 ρ 六量体は C6 対称構造を持つと予測されたが、これは従来提唱されほぼ定説となっていた D3 対称構造とは相容れないものであった。ここで申請者は D3 対称説の根拠とされていた化学架橋実験のデータと解釈に不備があることに気付き、より広範な架橋剤と反応条件を用いて再実験を行った。得られた詳細なデータに数理モデルを用いた理論的解析を加えることにより、 ρ は D3 対称ではなくやはり F1-ATPase と同様に C6 対称構造をとっていることを証明した。この解析を通じて、 ρ の高次構造に関する従来の誤った考えが改められ、その正しい枠組みが指し示された。申請者は、さらに ρ が DNA の複製・組み換えに関与する六量体ヘリカーゼ群と構造的にも機構的にも類似していることに着目して、 ρ はその環状六量体の中心穴に RNA 鎖を通してその上を移動するという新しい作用機構モデルを提出している。

以上の成果は転写終結機構の研究に新局面を切り開いたものといえ、その意義と独創性は高く評価されよう。よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本論文および参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について試問した結果、合格と認めた。