

氏名	武藤 誠 <small>たけとう まこと</small>
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第 493 号
学位授与の日付	昭和 53 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	<b>Biosynthesis of RNA Polymerase in Escherichia coli</b> (大腸菌に於ける RNA ポリメラーゼの生合成)

論文調査委員 (主査) 教授 松本清一 教授 植竹久雄 教授 伊藤洋平

### 論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌の DNA 依存 RNA ポリメラーゼは  $\alpha_2\beta\beta'$  なるサブユニット構造を持つコア酵素と、これに  $\sigma$  サブユニットの添加したホロ酵素があって、RNA 合成の開始には  $\sigma$  の存在が必須であるが、それ以後の RNA 鎖伸長反応は、コア酵素が触媒する。本酵素は代謝的に安定で、野生株内では全く分解することなく保持されるので、細胞内に於ける本酵素の量的調節は、本酵素の形成機構により一義的に支配されており、その意味で本酵素の細胞内での形成機構とその制御を知ることは極めて重要な課題である。

試験管内再構成法によって、本酵素は  $\alpha_2 \xrightarrow{\beta} \alpha_2\beta \xrightarrow{\beta'} \alpha_2\beta\beta'$  (未熟型コア酵素)  $\rightarrow$  E (活性コア酵素) の順に各サブユニットの集合と未熟型コア酵素の活性化により形成されることが解明されたが、この様な段階的で連続的な形成機構が、実際に *in vivo* でも起きていることを確認する為には、第一に、 $\alpha_2$ 、 $\alpha_2\beta$ 、 $\alpha_2\beta\beta'$  (未熟型コア酵素) などの形成中間体の *in vivo* での存在を確認すること、第二に、これらの各形成段階に障害を来たした突然変異株を見出すことが必要であろう。

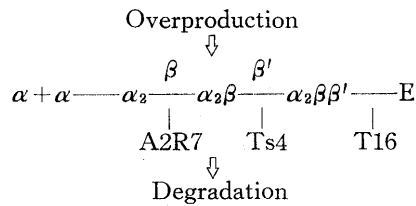
本論文は、上記第二点に関し、その様な形成不全突然変異株を発見した世界で最初の報告であると同時に、生体内でも *in vitro* 再構成実験の場合と同じ過程で本酵素が形成されることの決定的な証明をしたことになる。

IV. の論文で扱っている大腸菌の高温感受性変異株 Ts4 及 T16 は、Kirschbaum ら、及 Khesin らにより分離され、遺伝学的解析により、RNA ポリメラーゼの  $\beta'$  遺伝子に、一方 V の論文で扱っている変異株 A2RT は、 $\beta$  遺伝子に突然変異を持つことが知られている。

これらの変異株に於ける各サブユニットの集合と、未熟型コア酵素の活性化について調べる為、以下の実験を行った。

$^3\text{H}$ -ロイシンでパルス・ラベルした培養細胞の粗抽出液をグリセロール密度勾配遠心で分画し、各画分に抗 RNA ポリメラーゼ抗体を加えて得られた沈澱を、ポリアクリルアミドゲルの電気泳動にかけ、各サブユニット蛋白の定量を行った。

結果は、対照とした野生株 X240の場合、大部分のサブユニットが、14Sの活性ポリメラーゼの位置に大きなピークをつくっており、他に9S域と4S域にそれぞれ $\alpha_2\beta$ 及び遊離 $\alpha$ サブユニットの小さな肩及びピークを作るのに対し、変異株Ts4では、9Sの画分に $\alpha_2\beta$ 複合体の大きなピークが、変異株T16では9S域に頂点を持ち、14S域まで尾を引く $\alpha_2\beta\beta'$ (未熟型コア酵素)の大きなピークが観察される。又、 $\beta$ 変異株A2RTでは、9S域に $\alpha_2\beta$ 、 $\alpha_2\beta\beta'$ の双方がピークをつくり、更に4S域に、遊離 $\alpha$ サブユニットの大きなピークが観察される。30°Cで観察されるこれらの現象は、42°Cでは更に著しくなる。これら形成不全変異株では、 $\beta$ 、 $\beta'$ 、 $\sigma$ の各サブユニットの分解が著しいが、(参考論文1参照)これは、 $\alpha_2\beta$ や $\alpha_2\beta\beta'$ あるいは遊離 $\sigma$ サブユニットなど、野生株ではわずかしか存在しない形成中間体や遊離サブユニットが蓄積すると、生体内ではこれを異常な蛋白として認識し、分解する機構が存在することを示唆している。更にこれら変異株では、生体内活性酵素の量が不足することが予測されるが、野生株にくらべて各サブユニットの過剰合成が起きており(参考論文1参照)、本酵素サブユニットの合成が、本酵素蛋白自身により制御されている所謂自己制御 (autogenous regulation) により調節されていることを示唆している。本論文での形成不全変異株に関する報告をまとめると下図の様に表される。



### 論文審査の結果の要旨

大腸菌RNAポリメラーゼ (RNA Pase) には  $\alpha_2\beta\beta'$  構造をもつコア酵素と、 $\alpha_2\beta\beta'\sigma$  構造をもつホロ酵素があり、RNA合成開始には $\sigma$ 、RNA鎖の伸長合成にはコア酵素が関与する。

本酵素は *in vitro* 再構成法で  $2\alpha \rightarrow \alpha_2 \rightarrow \alpha_2\beta \rightarrow \alpha_2\beta\beta'$  (未熟型コア酵素)  $\rightarrow E$  (活性コア酵素) の順にサブユニットが集合して形成されることが知られている。*in vivo* でも同様のステップを経て形成されるか否かを、サブユニット突然変異体を利用して調べたのが本論文の研究である。

$\beta$  遺伝子の温度感受性 (ta) 変異株A2R<sub>7</sub>では $\alpha_2\beta$ 形成障害の結果 $\alpha$ が異常蓄積する。 $\beta'$  遺伝子のts変異体T1株とT16株では $\alpha_2\beta$ 、 $\alpha_2\beta\beta'$ が夫々異常蓄積すると共に、 $\beta$ 、 $\beta'$ 、 $\sigma$ 各サブユニットの分解が著しい。これらの所見は *in vivo* でも *in vitro* と同じ経過でサブユニットの集合が進行して RNA Pase が形成されることを示し、且正常では蓄積しないサブユニットを分解する機構の存在を示唆する。

本研究は RNA Pase の生体内合成過程を始めて明かにすると同時に、それに関する制御機構についても示唆を与えたもので、RNA 合成 (転写) に関して寄与するところ極めて大きい。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。