

氏名	梶崎弘幸
学位の種類	理学博士
学位記番号	論理博第605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2項該当
学位論文題目	Studies on Specificity of Restriction Endonucleases (制限エンドヌクレアーゼの特異性に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 高浪 満 教授 小関 治男 教授 大井 龍夫

論文内容の要旨

制限エンドヌクレアーゼは本来ウィルスなどの外来のDNAを分解排除する生物固有の防御機構に關与する酵素として発見されたものであり、特異性と補酵素要求性の点からI型とII型に分類されている。いづれもDNAの決まった塩基配列を識別して二本鎖を切断するが、I型酵素は反応にS-アデノシルメチオン、ATP、Mgを必要とし、切断点は一定していない。これに対してII型酵素は反応にMgのみを必要とし、4～6ケの決まった塩基配列の部位(識別部位)でDNAを切断する。また一般に切断部位の塩基配列は二回々転対称性をもつことを特徴とする。この酵素を用いれば長いDNA分子を特異的に切断することができるので、DNAの構造研究に応用することができる。

申請者はこの種の酵素の有用性に着目、Haemophilus 属の細菌から分離した数種の酵素について特異性の解析をおこなった。そのなかで H. aphirophilus から分離した酵素 R・Hap II の特異性は末端付近の塩基配列の分析から比較的簡単に決定することができた。この酵素は DNA を C—C—G—G (5'→3') という塩基配列の部位で C—C の間を切断する。つまりこの酵素は典型的なII型酵素としての特徴を有する。ところが H. gallinarum から分離した酵素 R・Hga I は、DNA を特異的に切断するにもかかわらず切断部位にユニークな塩基配列を同定することができなかつた。そこでこの酵素の切断点を有する数種のDNAについて、切断点を含む広い領域の塩基配列を決定すると共に、切断点からの塩基配列も決定しその比較をおこなった。その結果、切断点から少し離れた部位にユニークな塩基配列が含まれていることを発見した(主論文I)。

この酵素は G—C—G—T—C (5'→3') という塩基配列から10塩基上流で、相補鎖のほうは5塩基上流で二本鎖を切断する。明らかに従来発見されていたII型酵素とは異なった新しい型の酵素とみなすことができる。この酵素の発見により長いDNA分子の正確な切断点地図の作製が容易となった。この酵素は5ケの相補的な塩基配列を末端に残すようにDNAを切断するが、その部位の塩基配列は切断点ごとに異なるので、末端の塩基配列から切断されたDNAを再構成することができる。

特異性を決定した酵素の応用研究として申請者は、大腸菌フェージ fd DNA から特性の類似した2つのプロモーターを含むDNA断片を切り出し直接DNA分析法によりその塩基配列を決定した。その結果をプロモーターからの転写産物の塩基配列と比較することにより、RNA合成開始点から約10塩基対上流に6ケのユニークな塩基配列が含まれていることを明らかにした。また、プロモーターを含むDNA断片をRNAポリメラーゼで転写したとき、DNA断片の末端で相補鎖の読み返しがおこることを発見した(主論文Ⅱ)。その他、DNAの塩基配列決定法の開発研究をおこなうと共に、fd DNA の各種遺伝子領域の塩基配列の決定をおこなった(参考論文1~13)。

論文審査の結果の要旨

申請論文は二本鎖DNAを特異的に切断する制限エンドヌクレアーゼの基質特異性について研究をおこなったもので、特に *Haemophilus gallinarum* から分離した制限エンドヌクレアーゼ R·Hga I が従来発見されていた酵素とは全く異なったユニークな切断点特異性を有することを発見したものである。

制限エンドヌクレアーゼはDNAの塩基配列を識別して切断する酵素で、種々の細菌から発見されDNAの一次構造の決定に重要な役割を果している。従来発見されていた酵素はいずれも二回回転対称性を有する4~6個の塩基対を識別して、その塩基配列の部位で二本鎖切断をおこなうことを特徴としてきた。申請者が *H. aphirophilus* から分離し特異性を決定した酵素 R·Hap II もその一つで、C—C—G—Gという配列の部位でC—Cの間を切断する。ところが同じ *Haemophilus* 属の *H. gallinarum* から分離した R·Hga I はDNAの特異的切断をおこなすにもかかわらず、切断部位に特異的な塩基配列を同定することができなかつた。そこで申請者はこの酵素の切断点を有する数種のDNAについて、切断点を含む広い領域の塩基配列を決定すると共に切断点からの塩基配列も決定しその比較をおこなった。その結果、切断点から少し離れた部位にユニークな塩基配列が存在することを発見した(主論文Ⅰ)。この酵素はG—C—G—T—Cという配列から10塩基上流で、また相補鎖のほうは5塩基上流で二本鎖を切断する。明らかに従来発見されていた制限エンドヌクレアーゼとは作用様式が異なり、また識別部位と見られる塩基配列には二回回転対称性がないので、新しい型の酵素とみなすことができる。

この研究はこのように新しい型の酵素の特異性を決定したのみならず、その成果はDNAの一次構造決定にも大きく貢献した。つまり、この酵素は切断点に固有な5個の相補的な塩基配列を末端に残すように切断するためその塩基配列の分析から切断点地図を作製することができる。申請者は更にプロモーターを含むDNA断片を切り出し、その塩基配列を決定した(主論文Ⅱ)。その他、DNAの各種遺伝子領域の塩基配列を決定し、fd DNA の全塩基配列の決定に寄与した(参考論文1~13)。

以上、申請者は新しい型の制限エンドヌクレアーゼの特異性を決定すると共にDNAの一次構造の研究に画期的成果を挙げ、その業績はこの方面の研究の進展に寄与する所多大である。

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。