

氏名	後藤 秀幸 ごとう ひでゆき
学位の種類	農学博士
学位記番号	農博第298号
学位授与の日付	昭和54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	農学研究科食品工学専攻
学位論文題目	Studies on cauliflower DNA-dependent RNA polymerases (カリフラワールの DNA 依存 RNA ポリメラーゼに関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 上久保 正 教授 駒野 徹 教授 枚下雪郎

論文内容の要旨

本論文は有核細胞の DNA 依存 RNA ポリメラーゼの構造と機能を明らかにする目的で、カリフラワーを研究材料として当該酵素を抽出・精製・分画し、その酵素化学的、タンパク質化学的性質を検討し、得られた酵素の機能(鋳型特異性)について検討した結果をまとめたものである。

著者はカリフラワー花序を磨砕、超音波処理、ポリクラール AT、ポリエチレンイミン処理、イオン交換クロマトグラフィー等の方法を組合せ、有核細胞の RNA ポリメラーゼに特異的な阻害剤である α -アマニチンに対する感受性の相違を利用して、酵素 I, II, III を精製・分画した。これら3種の酵素の転写反応における二価金属 Mn^{2+} , Mg^{2+} 要求性及び硫安の影響を調べた結果、有核細胞の RNA ポリメラーゼ一般に見られる特徴が認められた。各酵素とも $55^{\circ}C$, 5分間の温置で完全に失活し、 $47^{\circ}C$ では酵素 I, III, IIの順に不安定であった。 α -アマニチンの RNA ポリメラーゼ活性阻害効果を調べた結果、酵素 II, III はそれぞれ $0.033 \mu g/ml$, $200 \mu g/ml$ で50%阻害を受け、I は $200 \mu g/ml$ では全く阻害されなかった。

精製分画したカリフラワー酵素 I, II, III をグリセロール密度勾配遠心法により分子量及び沈降定数を算出した結果、それぞれ $400,000(12S)$, $650,000(22S)$, $700,000(23S)$ と推定した。さらに、酵素 II, III を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で検討した結果、II は分子量(モル比)が $180,000(1)$, $130,000(2)$, $48,000(2)$, $25,000(4)$, $19,500(4)$ の5つのサブユニットからなり、III は、 $165,000(0.4)$, $145,000(0.6)$, $115,000(0.1)$ で分子量 $70,000$ 以下のサブユニット多数から成ることが推測された。

次に、カリフラワー酵素 I, II, III の鋳型特異性を明らかにするため、塩基配列既知の4種の合成 DNA、すなわち一本鎖 homopolymer, random copolymer, 二本鎖 alternating copolymer 及び二本鎖 homopolymer を鋳型とした時の取り込みを調べた結果、次のことが明らかとなった。

- 1) 一本鎖 homopolymer を鋳型とした時、酵素 I, II, III ともに poly(dT), poly(dC) をよく読み、poly(dA), poly(dG) を読まない。各酵素の poly(dT), poly(dC) に対する特異性は異なる。
- 2) 各酵素は poly(dA, dT) をよく読み、酵素 I は poly(dC, dT) もよく読む。

3) 各酵素とも poly(dG-dC) を読まず、酵素 I, II は poly(dG) · poly(dC) をよく読む。

以上の結果から各酵素には異なった鋳型特異性のあることが明らかとなった。

上述の鋳型特異性が転写反応における鋳型との Binding (結合), Initiation (転写開始), Elongation (連鎖), Termination (終結) のどの段階に関与するのかわ、ポリヌクレオチドの有する酵素・鋳型結合の拮抗阻害作用を利用して調べ、Initiation 段階に関与することを結論した。

論文審査の結果の要旨

DNA 依存 RNA ポリメラーゼは遺伝子 DNA の遺伝情報を転写し、相応する RNA を合成する酵素で、タンパク質合成に関与する mRNA, rRNA, tRNA はすべてこの酵素により合成される。細菌等の無核細胞においてはこの酵素の作用に関してかなり明らかにされているが有核細胞ではまだ充分明らかではない。

著者はカリフラワーを研究材料に選び、本酵素を抽出・精製・分画し、得られた酵素の酵素化学的諸性質を明らかにし、次いでそれらの転写機構を合成鋳型を用いて明らかにしようとした。すなわち、カリフラワー花序を磨砕、超音波処理、ポリクラール AT 処理、超遠心分離して得られる粗酵素液を DEAE-Sephadex A-25 及び P-セルローズのカラムクロマトグラフィーで分離精製して酵素 I, 酵素 II を得た。また同花序磨砕物を超音波処理、ポリエチレンイミン沈殿法、DEAE-Sephadex A-25 及び P-セルローズカラムクロマトグラフィーで分離精製して酵素 III を得た。

α -アミニチンに対する特異的な感受性により識別した酵素 I, II, III の転写反応における二価金属 Mn^{2+} , Mg^{2+} 要求性、硫酸の影響を調べ、有核細胞の RNA ポリメラーゼ一般に見られる傾向を認めた。各酵素とも 55°C, 5 分間の温置で完全に失活した。

精製分画したカリフラワー酵素 I, II, III をグリセロール密度勾配遠心法により、分子量、沈降定数を算出し、それぞれ分子量 400,000 (沈降定数 12S), 650,000 (22S), 700,000 (23S) と推定した。さらに SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により酵素 II, III についてサブユニット構造を明らかにした。

カリフラワー酵素 I, II, III の鋳型特異性を明らかにせるため、塩基配列既知の合成 DNA を用いて調べて、各酵素は異なった鋳型特異性を有することを認めた。さらにこれらの鋳型特異性が転写反応における鋳型との Binding (結合), Initiation (転写開始), Elongation (連鎖), Termination (終結) のどの段階に関与するかを検討し、Initiation の段階における特異性を反映していると結論した。すなわちこれらの酵素の各々は特異的な配列を認識することにより、情報の転写の調節に関与していると考えられる。

以上のように本論文は有核細胞の DNA 依存 RNA ポリメラーゼの酵素化学的性質を明らかにし、その構造と機能に新発見を加えたもので、分子生物学、生化学の分野に貢献するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。