

氏名	青山卓史 あお やま たか し
学位の種類	理学博士
学位記番号	論理博第972号
学位授与の日付	昭和62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	Essential Structure of <i>E. coli</i> Promoter (大腸菌プロモーターの基本構造)

論文調査委員 (主査) 教授 高浪 満 教授 今井六雄 教授 柳田充弘

論文内容の要旨

大腸菌系のプロモーターの構造に関しては、これまでの膨大な研究によって、RNA 合成開始点の上流-35塩基対付近及び-10塩基対付近の配列がプロモーター活性に重要な役割を果たしており、それぞれの領域に TTGACA, TATAAT という配列が出現する頻度が高いことが知られている。しかしながら-35共通配列、-10共通配列と呼ばれているこれらの配列は、プロモーターの間でそれぞれ少しずつ異っており、天然のプロモーターで両方に完全な共通配列を持つものは見つかっていない。しかも、両配列間の距離も数塩基対の範囲で変動する。このようなプロモーター構造の多様性はプロモーターの強度やプロモーターの性質と深い関連があると考えられ、その関連を解析することは転写調節の機構を理解する上で極めて重要である。そこで、-35と-10領域共に完全な共通配列を持つ人工プロモーターを作製し、更にその構造を系統的に改変することにより、プロモーターの一次構造並びに高次構造とプロモーター機能の関連について解析を行なった。

先ず、DNA の一次構造とプロモーター機能の関連について、主として *in vitro* 転写系を用いた解析により、次のような結果を得た。(a)この人工のプロモーターは、共通配列間の距離を至適としたとき非常に強い活性を示す。至適距離は17塩基対で、1塩基対の増減でも活性は著しく低下する。(b)調べた限りでは、-35と-10領域以外にプロモーター活性に大きく影響する配列は見出されない。転写開始点付近の配列はむしろプロモーターの温度及び塩濃度依存性に影響を及ぼす。(c)転写開始点は-10共通配列からの距離によってさまざまであり、原則として7塩基対下流の Pu で、その位置が Py のときは近傍の Pu で開始する。従来から指摘されていた CAT 配列は特に影響がない。

次に、CG 繰り返し配列を人工プロモーターの上流に挿入し、超ラセンを導入することにより、DNA の高次構造とプロモーター機能の関連を調べた。具体的には、人工プロモーターの上流の異なる位置に23~25塩基対の CG 繰り返し配列を挿入したプラスミド(環状二本鎖 DNA)を作成し、エチジウムブロミドとトポイソメラーゼ I を用いて異なった負の超ラセン密度をもつ分子を作成した。これらの分子についてプロモーター活性を測定したところ、CG 配列をすぐ上流に持つプロモーターでは、超ラセン密度

が -0.04 以下で顕著な活性の低下が見られた。この条件下で CG 配列領域は Z 型ヘリックスを形成することが知られているので、Z 型構造の形成により近傍の -35 領域の B 型ヘリックス構造を変形させることによると推定された。つまりこのことは、少なくとも -35 領域が B 型構造をとることがプロモーター機能に必須であることを示している。

この実験で得られたもう 1 つの知見は、超ラセンにより大きく影響をうける天然のプロモーターに比べて、 -35 と -10 の領域共に完全な共通配列を持つ人工プロモーターは超ラセンにより殆ど影響をうけないことが分かったことである。このことは、RNA ポリメラーゼは B 型ヘリックスをとり示適距離にある -35 と -10 共通配列領域と相互作用してプロモーターに結合するが、多くの天然のプロモーターのように配列自体や共通配列間の距離が多様である場合には、適度の超コイル導入が RNA ポリメラーゼの結合に必要であると解釈される。

論文審査の結果の要旨

転写開始のシグナル領域であるプロモーターの塩基配列については古くから大腸菌系について多くの研究が行なわれ、RNA 合成開始点の上流 -35 塩基対付近及び -10 塩基対付近に 6 ケの配列が出現する頻度が高いことが知られており、それぞれ -35 共通配列、 -10 共通配列と呼んでいる。しかし天然のプロモーターではこれらの配列は少しずつ異なっており、しかも、両配列間の距離も数塩基対の範囲で変動するため、与えられた塩基配列からプロモーターの位置や強度を予測することはできない状況である。申請者の研究は、このような大腸菌プロモーターの構造について更に詳細な知見をうるため、 -35 と -10 領域に完全な共通配列を持つ人工プロモーターを合成し、遺伝子工学的手法によりその構造を系統的に改変することによって、プロモーターの一次構造並びに高次構造とプロモーター機能の関連について解析を行ったものである。

先ず、一次構造とプロモーター機能の関連について実験を行なった結果、プロモーターは共通配列間の距離を 17 塩基対にしたときに非常に強い活性を示すこと、 -35 と -10 領域以外にプロモーター活性に大きく影響する配列は見出されないこと、転写開始点付近の配列はプロモーターの温度及び塩濃度依存性に影響を及ぼすこと、転写開始点は -10 共通配列からの距離によってきまっており、従来から指摘されていた CAT 配列には影響されないこと、などの点を明らかにした。

次に、DNA 高次構造とプロモーター機能の関連を解析するため、CG 繰り返し配列を人工プロモーターの上流の異なる位置に挿入し、超ラセン構造を導入してプロモーター機能への影響を解析した。水溶液中で二本鎖 DNA は、約 10.5 塩基対で一回転する右巻 (B 型) ラセン構造をとっているが、負の超ラセンを導入すると CG 繰り返し配列領域は左巻 (Z 型) ラセン構造をとるようになる。また天然のプロモーターの多くは、負の超ラセンの導入により活性が増加することが知られている。実験の結果、CG 配列をすぐ上流に持つプロモーターでは、超ラセン密度が -0.04 以下で活性が顕著に低下することを見出した。このような活性の低下は、CG 配列を -35 領域から 1 ピッチ以上離すと起こらない。このことは、 -35 領域が B 型ヘリックス構造をとることがプロモーター機能に必須であるが、すぐ上流の立体構造を変換してもプロモーター機能に影響しないことを示している。

この研究で得たもう1つの重要な知見は、天然のプロモーターの多くが、超ラセンにより大きく影響を受けるのに対して、-35と-10領域に完全な共通配列を持つ人工プロモーターは超ラセンにより殆ど影響をうけないことである。このことは、最適構造を持つプロモーターではそのまま RNA ポリメラーゼの結合がおこるが、天然のプロモーターのように最適構造から変異しているものでは、適度の超コイルの導入による立体構造の変形が必要であることを示している。

以上のような研究成果は、大腸菌プロモーターの基本的な構造について重要な知見を提供するものであり、よって本論文は理学博士授与に価するものと認めた。

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