

氏 名	志 村 令 郎 し むら よし ろう
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	論 理 博 第 245 号
学位授与の日付	昭 和 43 年 7 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	Differential Synthesis of Bacteriophage Proteins Directed by a Fragment of MS2 RNA (MS 2 の RNA フラグメントに指令されるバクテリオファージ蛋白質の区別的な合成)
論文調査委員	(主 査) 教授 芦田譲治 教授 北村四郎 教授 竹内郁夫 教授 杉野幸夫

論 文 内 容 の 要 旨

MS 2 ファージは、f 2 グループに属する大腸菌ファージであって、そのゲノムとして、一本鎖の RNA 1 個をもっている。この RNA の分子量は 1.1×10^6 であり、したがって約 3 千個のヌクレオチドをもつ。もし、このヌクレオチドのすべてが、ファージ蛋白質合成のコードになるとしても、そのコドンの数は約 1 千個であり、合成される蛋白質の種類が少ないことが想像される。事実、申請者らのグループは、感染菌から 3 種類のファージ蛋白質を分離したが、これは Zinder のグループその他の遺伝学的な解析によって、3 個のシストロンの存在が確かめられたことと一致する。

試験管中で、この RNA に大腸菌の抽出液を加えると、感染菌で合成されるファージ蛋白質に相応する蛋白質が合成される。現在、ファージ RNA の間で、遺伝子の組み換えが知られていないので、上記 3 種の蛋白質に対応するシストロンの位置は、遺伝学的解析によって決定できない。そこで申請者は、いろいろな方法でファージ RNA のフラグメントをとり、無細胞系で、このフラグメントをメッセンジャーとしてつくられる蛋白質を解析し、また、そのフラグメントの位置を決定することによって、各シストロンの相対的な位置を決定することを試み、これに成功した。

MS 2 ファージを大腸菌に感染させ、続いて培地に 5-フルオロウラシル (FU) を加えると、ウラシルの少なくとも 80% が FU で置換され、かつ、CsCl 密度勾配遠心での密度の小さい不完全粒子が形成される。この不完全粒子は、電子顕微鏡観察では、普通の MS 2 ファージと区別できないが、感染性をもたない。浮遊密度、紫外線吸収および化学的な RNA の定量から、この粒子の RNA 量は、正常なファージ粒子の約 $\frac{1}{3}$ であると計算されたが、事実、この不完全粒子から RNA を抽出し、その沈降速度をしらべると 20s であって、これは MS 2 の RNA (27s) の約 $\frac{1}{3}$ のポリヌクレオチドに相当することがわかった。

この RNA フラグメントは大腸菌のスフェロプラストに対しても感染性をもたないが、無細胞系でのメッセンジャーとしての活性は非常に高い。このフラグメントを鋳型として無細胞系で蛋白質を合成させ、これをペプチドのフィンガープリント、セファデックス G 200 のクロマトグラフィー、およびポリアクリル

アミドゲル中での電気泳動で解析したところ、ファージの3種の蛋白質の内、コート蛋白と成熟蛋白は合成されているが、RNA合成酵素は合成されていないことがわかった。この合成の欠除が、メッセンジャー分子中のFUの影響によるものでないことは、同程度にFUを含んだRNAでも、RNA分子が完全な長さであれば、3種の蛋白質すべてが合成される事実、および、リボヌクレアーゼ T_1 による処理、あるいはアンバー型変異株から得た同様なRNAフラグメントでも、RNA合成酵素に相当する蛋白質だけがつくられないことから理解される。

以上により、FUを含むフラグメントが、ファージの特異的な部分に欠損をもつことが示唆されるが、申請者は、その欠損部分の位置を、末端解析により明らかにした。MS2ファージの5'末端には、GTPが存在し、3'末端には3個の磷酸基がないので、このRNAをアルカリ分解すれば、1個のRNA分子当たり1個のヌクレオシド四リン酸ができるはずである。FUを含むフラグメントをアルカリで分解し、電気泳動で分離したところ、このヌクレオシド四リン酸が検出され、しかも、生じたヌクレオシド四リン酸と一リン酸化物との量比から、用いたフラグメントがMS2、RNAの約 $\frac{1}{3}$ であることも裏づけられた。

以上の実験事実から、FUを含むフラグメントは、ファージRNAの5'末端から約 $\frac{1}{3}$ の部分のものであって、ファージのコート蛋白と成熟蛋白とのシストロンを、完全にもっていることが明らかとなり、したがって、RNA合成酵素のシストロンは、MS2 RNAの分子中で、3'末端に最も近く存在することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

RNAファージであるMS2の含有するRNAについては、試験管内の蛋白合成において、それが3種の蛋白質を指令すること、その他の現象から見て、3個のシストロンをもつことが最近確かめられた。主論文は、MS2のRNAのフラグメントを分離し、これを用いて試験管中で蛋白合成を行なわせることにより、1つのシストロンの位置を決定したものである。

申請者は、用いたフラグメントの指令によって合成される蛋白質が、コート蛋白と成熟蛋白とであり、RNA合成酵素は合成されないことを見出し、従って、用いたフラグメントは、RNA合成酵素のシストロンに欠損をもつと推定した。用いたフラグメントは、正常なMS2 RNAの約 $\frac{1}{3}$ の大きさをもつこと、および、その5'末端には、正常なMS2 RNAと同じく三リン酸化物が存在することを巧妙に証明して、RNA合成酵素のシストロンが、他の2個のシストロンよりも3'末端の側に存在することを示した。

この主論文の研究は、シストロンの位置の決定に遺伝学的方法を利用し得ないRNAファージにおいて、その決定を可能にする新しい方法を提出したものであって、分子遺伝学上注目すべき貢献をなしている。

参考論文その1は、一種の原生動物の体内に共生する細菌のDNA型を明らかにしたものであり、その4は、ウキクサに含有されるある種の酵素を精製し、その性状を調べたものである。

参考論文その2、その3、およびその6は、5フルオロウラシルをとりこんだMS2 RNAの性状を調べたものであって、正常RNAの約 $\frac{1}{3}$ のフラグメントが存在することを発見し、主論文の研究を案出す

る基礎となったものである。参考論文その5は、二、三のファージのRNAの指令により、大腸菌体内および試験管内で合成される蛋白質の性状を明らかにし、また蛋白合成の制御が、この両系において相似であることを示したものであり、その7は、これらに関する問題の総合抄録である。

以上の如く、主論文および参考論文は、学術上貢献するところが大きいものであり、また申請者の高い研究能力と広い学識を示すものである。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認める。