

氏 名	川 井 信 かわ い まこと
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 444 号
学位授与の日付	昭 和 52 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	温度感受性変異型 RNA ポリメラーゼの遺伝生化学的研究

論文調査委員 (主 査)
教 授 由 良 隆 教 授 川 出 由 己 教 授 香 月 裕 彦

論 文 内 容 の 要 旨

RNA ポリメラーゼは、遺伝子 DNA を鋳型として 4 種の基質（ヌクレオシド 3 磷酸）を重合し、DNA の一方の鎖に相補的な一本鎖の RNA を合成する反応を触媒する酵素である。この酵素は 4 種のサブユニット (α , β , β' , σ) から成る。

申請者は大腸菌の温度感受性変異株を用いて RNA ポリメラーゼの構造と機能の問題を解析することを試みた。先づポリメラーゼの β サブユニットに特異的に結合して RNA 合成能を阻害するリファンピシンに耐性で、かつ高温では生育し得ない温度感受性変異株からこの酵素を精製した。次に温度感受性変異が、幾つかの RNA 合成素反応のどの過程に影響を与えたかを酵素化学的に調べた。その結果、ポリメラーゼの DNA への結合や、RNA 合成開始反応は正常であるが、RNA 鎖伸長反応が著しく熱失活し易くなっていることを見出した。リファンピシンは RNA 合成開始反応を特異的に阻害するからそれに耐性を示す変異型酵素は開始反応に関しても野生型酵素とは異なっている。従って酵素の熱感受性の解析結果と合わせて考えると、この変異型酵素では RNA 合成の開始反応と RNA 鎖伸長反応の両者が何れも野生型酵素とは異なることを明確に示している。

次に野生型酵素および変異型酵素を完全に精製し、尿素処理後各構成サブユニットを単離し、それらのサブユニットを種々の組合せで混ぜて活性酵素を再構成させ、その性質（リファンピシン耐性および熱感受性）を調べた。その結果、変異型ポリメラーゼのリファンピシン耐性と熱感受性はいずれも第一義的には β サブユニットの構造変化によることが明らかになった。この事実と、先の熱感受性反応段階に関する実験結果を総合すると、大腸菌 RNA ポリメラーゼの示すリファンピシン感受性および RNA 鎖伸長反応の触媒活性は主として β サブユニットによることが示唆される。リファンピシンは開始反応を阻害するから、結局 β サブユニットは RNA 合成の開始反応と鎖伸長反応の両方に必須の役割を演じていると考えられる。

尚、上記のポリメラーゼ再構成実験の結果は、 β 以外のコアサブユニット (α , β') も、リファンピシン

感受性および RNA 鎖伸長反応の熱感受性に対して第二義的な影響を与えうることを示唆する。この点に関しては、P1 フェージを用いた形質導入実験により遺伝学的に上記の推論を少なくとも部分的に支持する結果を得ている。

論文審査の結果の要旨

RNA ポリメラーゼは少なくとも 4 種類のサブユニット(α , β , β' , σ) からなる酵素で、遺伝情報を DNA から RNA に転写する反応を触媒する、すべての細胞にとって必須の酵素である。特に大腸菌のポリメラーゼについては過去 10 数年の間に多くの知見が蓄積されてきたが、申請者が本研究に着手した時点 (1969 年) ではその構造と機能の関係についての詳しい解析、特にサブユニットレベルでの研究は非常に少なかった。そこで既に申請者の属する研究室で分離解析されていた温度感受性株の中で、単一変異により RNA ポリメラーゼがリファンピシン耐性となり且高温では生育しえない大腸菌変異株を生化学的に詳しく解析することにより、この問題に接近を試みた。

まずこの変異株から RNA ポリメラーゼを精製し、その熱感受性を比較的高塩濃度の条件下で野生型酵素と比較すると明らかに高い感受性を示すことを確認した。次にポリメラーゼにより触媒される RNA 合成反応を幾つかの部分反応に分けて測定し、どの反応が熱失活を受け易いかを系統的に調べた。リファンピシンは RNA 合成開始段階を特異的に阻害する為、その耐性変異は開始反応段階を温度感受性に变化させると期待されたが、結果は予期に反し RNA 鎖伸長反応が感受性となっている事を明らかにした。このことは単一変異従って恐らく単一アミノ酸の変化が RNA ポリメラーゼの RNA 合成開始機能と鎖伸長触媒機能の両者に影響をもたらす事を意味している。申請者はこれらの結果から RNA 合成の開始、伸長両反応の活性中心が互に接近、または重なり合っていると推論している。

次に変異型酵素と野生型酵素を完全に精製し、尿素処理によりサブユニットに解離し、電気泳動で分画し単一サブユニット標品を得た。それらを種々の組合せで混合し活性酵素を再構成させ、その性質を調べることで変異型酵素の示す特性がどのサブユニットの変化によるかを知ることが出来る。この再構成実験の結果は β サブユニットの変化が主な原因であることを実証した。尚この実験の過程で、変異型酵素から由来する α , β' 両サブユニットが野生型酵素由来のそれらと性質がやゝ異なることを見出した。その原因として、(1) 第 2 の変異による、 α , β' の一次構造の変化、(2) β の構造変化による 2 次的効果、などの可能性があり、申請者は詳細な遺伝学的実験によって少なくとも β' の構造変化に関しては (1) の可能性のあることを明らかにした。

以上の様に本論文は RNA ポリメラーゼの特に β サブユニットの構造、機能に関して詳細な酵素化学的解析により、幾つかの新しい基礎的知見を付加したものである。よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。