

氏 名	竹 家 達 夫 たけ や たつ お
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 448 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	大腸菌ファージ T3 のプロモーターに関する研究

(主 査)
論文調査委員 教 授 高 浪 満 教 授 香 月 裕 彦 教 授 由 良 隆

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は遺伝情報発現の初期反応である転写の開始機構を解明するため、大腸菌ファージ T3DNA から RNA ポリメラーゼが特異的に結合して転写を開始する領域（プロモーター）を単離し、RNA ポリメラーゼとの相互作用の特異性を解析したものである。ファージ T3 の形質発現には大腸菌の RNA ポリメラーゼによる転写とファージ固有の RNA ポリメラーゼによる転写が必須であり、このことは T3DNA にはそれぞれの酵素に対するプロモーターが存在することを示している。したがってこの転写系を用いれば 2 種類の RNA ポリメラーゼによるプロモーター識別の特異性について比較研究をおこなうことが可能である。

まず T3DNA を鋳型として合成される RNA 鎖の開始末端ヌクレオチド配列と長さの分析をおこない、T3DNA には少なくとも大腸菌 RNA ポリメラーゼについて 2 ケ、T3RNA ポリメラーゼについて 4 ケのプロモーターが存在することを明らかにした。次に転写の開始過程で形成される DNA・RNA ポリメラーゼ複合体の安定性について研究をおこない、その結合が開始ヌクレオチドによる最初のリン酸ジエステル結合が形成されることにより安定化され高塩濃度でも解離しないことを発見した。またこのような開始複合体の形成能は T3DNA を制限エンドヌクレアーゼで切断しても失われないことを確かめた。そこで数種の制限エンドヌクレアーゼを用いて T3DNA を特異的に切断したあと、開始ヌクレオチドの存在下で大腸菌及び T3RNA ポリメラーゼに特異的に結合して安定な開始複合体を形成する DNA フラグメントを分離した。このようにして分離した DNA フラグメントはそれぞれの酵素と可逆的に結合し、また個々の DNA フラグメント上で合成される短い RNA 鎖はもとの T3DNA 上で合成される RNA 鎖と同じ開始末端を有する。このことから上記方法により完全なプロモーターを含む DNA フラグメントが単離されたと結論した。更に分離した個々のプロモーターを用いて RNA ポリメラーゼとの相互作用の特異性を比較すると共に、制限エンドヌクレアーゼによる T3DNA の切断点地図との対応性から T3DNA 上のプロモーターの位置の決定をおこなった。

この研究により長い DNA 分子からプロモーター領域を単離する方法が確立され、その後のプロモーターの構造研究に広く応用されている。また T3DNA のプロモーターの位置が決定されたことによってこのファージの転写様式が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

RNA ポリメラーゼが特異的に結合して転写を開始する DNA 領域（プロモーター）の構造並びに特性を解析することは遺伝情報の発現機構を解明するうえで重要であり、分子生物学における重要な研究課題の一つである。しかし転写単位あたり 1 ケ存在すると推定されるプロモーターの構造や特性を長い DNA 分子を用いて解析することは極めて困難である。そこで申請者は大腸菌ファージ T3 の DNA を材料としてプロモーター領域を分離し、RNA ポリメラーゼによるプロモーター識別の特異性を解析することを研究の目的とした。T3DNA には、大腸菌の RNA ポリメラーゼとファージ固有の RNA ポリメラーゼに対応するプロモーターが含まれているので、この材料から出発すればプロモーターの分離法の検討並びに分離したプロモーターについて特異性の比較研究が容易であるという点に着目したからでありすぐれた着想である。

分離法の原理は、プロモーターへの RNA ポリメラーゼの結合が開始ヌクレオチドによる最初のリン酸ジエステル結合が形成されることにより高度に安定化されるので個々のプロモーターから合成される RNA の開始ヌクレオチド配列を決定しておけばプロモーターに固有な開始複合体を形成させることができること、及び DNA を各種の制限エンドヌクレアーゼで特異的に切断してもプロモーターの特性が失われない、という知見に基づいている。このような方法で分離した DNA フラグメントは大腸菌及び T3 の RNA ポリメラーゼとそれぞれ可逆的に結合すること、分離した DNA フラグメント上で合成される短い RNA 鎖はもとの T3DNA 上で合成される RNA 鎖と同じ開始末端を有することから、上記方法により完全なプロモーターを含む DNA フラグメントが分離されることを証明した。更にこの方法で分離した個々のプロモーターを用い RNA ポリメラーゼとの相互作用の特異性を比較すると共に、制限エンドヌクレアーゼによる T3DNA の切断点地図との対応性から T3DNA 上のプロモーターの位置の決定もおこなっている。

この研究により、長い DNA 分子からプロモーター領域を分離する方法が確立され、プロモーターの構造研究に寄与するところが多い。参考論文(1)は、T3DNA 上で大腸菌及び T3 の RNA ポリメラーゼで合成される RNA の種別をおこなったものであり、参考論文(2)―(5)は、大腸菌チロシン tRNA 遺伝子の合成に関するものである。これらの論文は、申請者がすぐれた研究能力と学識をもつことを示している。

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。